

UTILISATION DE LA PROTEINE PKS 13 CODANT POUR  
LA CONDENSASE DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET  
GENRES APPARENTES COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.

La présente invention est relative à une  
5 nouvelle enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides  
mycoliques, et à son utilisation pour le criblage  
d'antibiotiques, notamment d'anti-mycobactériens.

Les acides mycoliques sont des acides gras à  
longue chaîne,  $\alpha$ -alkylés et  $\beta$ -hydroxylés, présents sous  
10 forme d'esters dans les parois cellulaires de bactéries  
d'une lignée phylogénétique particulière des  
actinomycètes, le sous-ordre des *Corynebacterineae*,  
également dénommés « mycolatas », comprenant les genres  
bactériens : *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*,  
15 *Nocardia*, *Gordona* et *Tsukamurella*.

Parmi les mycolatas, on trouve des pathogènes  
majeurs, notamment les mycobactéries *Mycobacterium*  
*tuberculosis*, agent de la tuberculose, et *Mycobacterium*  
*leprae*, agent de la lèpre.

20 Depuis une quinzaine d'années, on observe une  
recrudescence de la tuberculose, notamment dans les pays  
industrialisés. Ce phénomène est en partie lié à  
l'apparition de souches du bacille tuberculeux résistantes  
aux antibiotiques existants. Ainsi, la conception de  
25 nouveaux médicaments antituberculeux est redevenue une  
priorité importante.

Parmi les médicaments anti-tuberculeux les  
plus efficaces, se trouvent ceux qui interfèrent avec la  
biosynthèse de l'enveloppe des mycobactéries, tels que  
30 l'isoniazide, l'éthionamide et l'ethambutol (WEBB et al.,  
Molecular Biology and Virulence 1 : 287-307 (eds.  
Ratledge, C. & Dale, J.) (Blackwell Science Ltd, Oxford),  
1999). Les acides mycoliques représentent un constituant  
majeur de cette enveloppe. Il a été rapporté qu'ils  
35 intervenaient dans des fonctions biologiques importantes,  
participant notamment à la virulence bactérienne (GLICKMAN

et al., Mol. Cell 5 : 717-727, 2000). Ils sont également impliqués dans la faible perméabilité de l'enveloppe des mycolatas, qui leur confère une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques (JARLIER et al., J. Bacteriol. 172 : 1418-1423, 1990 ; BRENNAN et al., Annu. Rev. Biochem. 64 : 29-63, 1995 ; DAFE et DRAPER, Adv. Microb. Physiol. 39 : 131-203, 1998).

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des acides mycoliques varient en longueur et en structure (Figure 1A), mais présentent un motif commun (motif mycolique :  $-\text{CHOH}-\text{CHR}_2-\text{COOH}$ ), ce qui suggère qu'une étape enzymatique impliquée dans la formation de ce motif est commune à toutes les mycolatas.

Selon un modèle généralement accepté actuellement (GASTAMBIDE-ODIER et al., Biochemische Zeitschrift 333 : 285-295, 1960), les dernières étapes de la biosynthèse des acides mycoliques consisteraient en une cascade de réactions (Figure 1B) : (1) activation de l'acyle pour former une molécule d'acyl-CoA catalysée par une acyl-CoA synthase ; (2) carboxylation d'une molécule d'acyl-CoA pour former une molécule d'acylmalonyl-CoA catalysée par une acyl-CoA carboxylase ; (3) condensation de type Claisen ou malonique d'une molécule d'acyl-CoA ou acyl-AMP et d'une molécule d'acylmalonyl-CoA pour former l'intermédiaire  $\beta$ -céto acyle, catalysée par une condensase ; (4) réduction de l'intermédiaire  $\beta$ -céto acyle pour former l'acide mycolique catalysée par une réductase.

Le motif mycolique serait probablement formé lors de la réaction de condensation de type Claisen ou malonique. Toutefois, jusqu'à présent l'enzyme responsable de cette condensation n'avait pas été identifiée.

Cette réaction de condensation apparaît similaire à la condensation d'acyl-CoA avec le méthylmalonyl-CoA qui intervient dans la formation d'acides gras ramifiés polyméthylés chez les mycobactéries (MATHUR et al., J. Biol. Chem. 267 : 19388-19395, 1996 ; SIRAKOVA et al., J. Biol. Chem. 276 : 16833-16839, 2001 ;

DUBEY et al., Mol. Microbiol. 45: 1451-1459, 2000), où elle est catalysée par des polykétides synthases (Pks) de type I.

Les Inventeurs ont émis l'hypothèse que la  
5 réaction de condensation conduisant aux acides mycoliques chez les mycolatas pourrait être catalysée par une Pks de type I ayant une spécificité de substrat inhabituelle.

Pour vérifier cette hypothèse, ils ont d'abord recherché, à partir de séquences de mycolatas présentes  
10 dans les bases de données, s'il existait une Pks commune à ces bactéries et comprenant les domaines fonctionnels nécessaires à la réaction de condensation, à savoir : un domaine acyl transférase (AT), un domaine kétosynthase (KS), un domaine « acyl carrier protein » (ACP), et un  
15 domaine thioestérase (TE).

Ils ont ainsi identifié chez *M. tuberculosis*, un gène dénommé *pks13* codant pour une Pks de type I, ainsi que des orthologues de ce gène chez les autres mycobactéries, ainsi que chez les corynébactéries. Ces  
20 protéines possèdent de fortes similarités de séquence (70 à 80% d'identité sur toute la longueur de la protéine pour les différentes Pks13 mycobactériennes et 40 à 50% d'identité entre Pks13 de *M. tuberculosis* et Pks13 de *C. glutamicum* ou *C. diphtheriae*), et possèdent en outre les  
25 domaines, mentionnés ci-dessus, qui sont nécessaires à la réaction de condensation et au relargage du produit.

Ces protéines seront donc désignées ci-après sous le terme général « Pks13 »

Les Inventeurs ont en outre montré que  
30 l'inactivation du gène codant pour Pks13 conduisait au blocage de la synthèse des acides mycoliques, et à une perte de la viabilité bactérienne.

En outre, ils ont produit et purifié la protéine Pks13 sous forme recombinante.

35 Les résultats obtenus par les Inventeurs montrent que Pks13 est la condensase intervenant dans la synthèse des acides mycoliques, et qu'il s'agit d'une

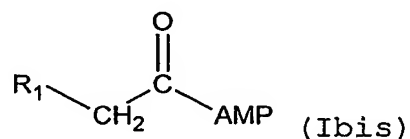
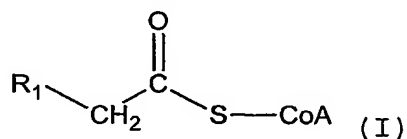
enzyme clé dans l'assemblage de l'enveloppe des mycolatas, et essentielle pour la viabilité des mycobactéries.

La présente invention a pour objet une protéine purifiée, dénommée Pks13, impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques et possédant les caractéristiques suivantes :

- a) elle possède au moins 40% d'identité, de préférence au moins 50% d'identité, et de manière tout à fait préférée au moins 60% d'identité sur la totalité de sa séquence, avec la protéine Pks13 de *M. tuberculosis* ;
- b) elle possède un domaine acyl transférase (pfam00698), un domaine kétoacylsynthase (pfam02801 ou pfam00109), au moins un domaine acyl carrier protein (COG0331 ou COG0304), et un domaine thioestérase (COG3319 ou pfam00975)
- c) elle catalyse une condensation de Claisen ou malonique entre une molécule d'acyl-CoA ou acyl-AMP et une molécule d'acylmalonyl-CoA.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite protéine Pks13 catalyse une condensation de Claisen entre :

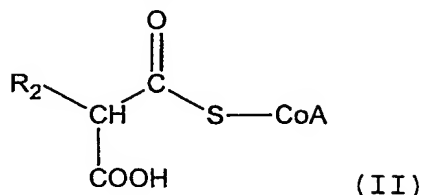
- a) une molécule d'acyl-CoA de formule I, ou une molécule d'acyl-AMP de formule Ibis :



- dans laquelle  $\text{R}_1$  est une chaîne comprenant de 6 à 68 atomes de carbone, pouvant contenir une ou plusieurs doubles liaisons  $-\text{C}=\text{C}-$ , et/ou un ou plusieurs cycles *cis/trans*-cyclopropane, et/ou un ou plusieurs groupes  $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ -\text{CH}-\text{O}-\text{C}- \\ || \\ \text{O} \end{array}$  et/ou pouvant porter un ou plusieurs groupes latéraux choisis parmi  $-\text{CH}_3$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_3$  ;

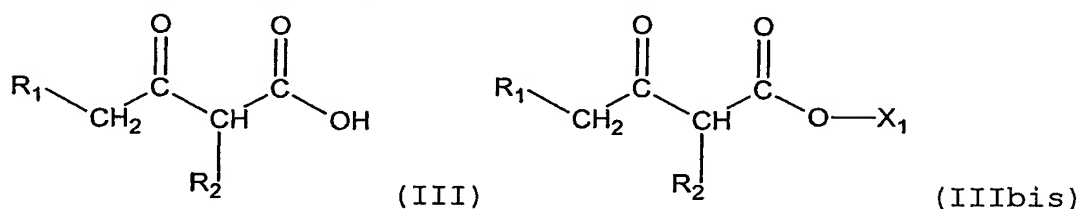
et

b) une molécule d'acylmalonyl-CoA de formule II :



dans laquelle R<sub>2</sub> est un alcane linéaire comprenant de 10 à 24 atomes de carbone ;

5 pour former un intermédiaire β-céto acyle de formule III, ou un β-céto ester de formule IIIbis :



dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont tels que définis ci-dessus, et X<sub>1</sub> est une molécule acceptrice.

10 Des dispositions particulières de ce mode de réalisation sont les suivantes :

- ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β-céto acyle de formule III ou de β-céto ester de formule IIIbis dans laquelle R<sub>1</sub> comprend de 6-16 atomes de carbone et R<sub>2</sub> comprend de 12 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Corynebacterium* ;

20 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β-céto acyle de formule III ou de β-céto ester de formule IIIbis dans laquelle R<sub>1</sub> comprend de 28-48 atomes de carbone et R<sub>2</sub> comprend de 14 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Gordona* ;

25 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un β-céto acyle de formule III ou de β-céto ester de formule IIIbis dans laquelle R<sub>1</sub> comprend de 42 à 68 atomes de carbone et R<sub>2</sub> comprend de 18 à 24 atomes de carbones.

Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Mycobacterium* ;

5                   - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -céto acyle de formule III ou de  $\beta$ -céto ester de formule IIIbis dans laquelle  $R_1$  comprend de 24 à 46 atomes de carbone et  $R_2$  comprend de 10 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Nocardia* ;

10                   - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -céto acyle de formule III ou de  $\beta$ -céto ester de formule IIIbis dans laquelle  $R_1$  comprend de 14 à 34 atomes de carbone et  $R_2$  comprend de 10 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Rhodococcus* ;

15                   - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -céto acyle de formule III ou de  $\beta$ -céto ester de formule IIIbis dans laquelle  $R_1$  comprend de 40 à 56 atomes de carbone et  $R_2$  comprend de 18 à 20 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Tsukamurella*.

20                   Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite protéine Pks13 possède au moins 70% d'identité avec la protéine Pks13 de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 1).

25                   Selon encore un autre mode de réalisation de la présente invention, ladite protéine Pks13 possède au moins 50% d'identité, de préférence au moins 60%, et de manière tout à fait préférée au moins 70% d'identité avec la protéine Pks13 de *Corynebacterium glutamicum* (SEQ ID NO: 2).

30                   La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression, comprenant une séquence polynucléotidique codant pour une protéine Pks13 conforme à l'invention, ainsi qu'une cellule-hôte, procaryote ou  
35 eucaryote, transformée par ledit vecteur d'expression.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'une protéine Pks13 conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule-hôte conforme à l'invention, et la  
5 purification de la protéine Pks13 à partir de ladite culture.

La présente invention a également pour objet un procédé pour inhiber la biosynthèse de l'enveloppe des mycolatas, caractérisé en ce qu'il comprend l'inhibition  
10 de l'expression ou de l'activité de la protéine Pks13 chez lesdites bactéries.

Du fait de son caractère essentiel pour la viabilité, et de sa spécificité d'action, la condensase Pks13 constitue une excellente cible potentielle pour la  
15 conception de nouveaux médicaments, notamment de nouveaux antituberculeux.

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation d'une condensase Pks13 conforme à l'invention, pour le criblage d'antibiotiques actifs sur  
20 les mycolatas, et notamment sur les mycobactéries.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples illustrant l'identification, la production, et la purification de la condensase Pks13,  
25 ainsi que les effets de son inactivation sur la viabilité des mycolatas.

#### **EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION DE LA CONDENSASE PKS13**

*M. tuberculosis* contient 16 Pks de type I parmi lesquelles 9 se retrouvent également chez *M. leprae*.  
30 Parmi ces 9 enzymes putatives, 7 sont déjà connues pour leur implication dans la biosynthèse d'autres groupes de lipides chez *M. tuberculosis* (AZAD et al., J. Biol. Chem. 272 : 16741-16745, 1997 ; CONSTANT et al., J. Biol. Chem. 277 : 38148-38158, 2002). Parmi les deux protéines  
35 candidates restantes, celle dénommée ML1229 présente la même organisation de domaine ainsi que de fortes

similarités de séquences avec les Pks de type I de *M. tuberculosis* impliquées dans la biosynthèse des acides gras polyméthyl ramifiés. Le second candidat est dénommé Pks13 dans *M. tuberculosis* et ML0101 dans *M. leprae*.

5 L'analyse de la séquence déduite de Pks13 (Numéro d'accèsion NP\_338459 ; 1733 acides aminés) de *M. tuberculosis* CDC1551 révèle la présence des différents domaines catalytiques nécessaires et suffisants pour la catalyse de la condensation de type Claisen intervenant  
10 dans la formation des acides mycoliques : deux domaines « Acyl carrier protein » (ACP) (acides aminés 39 à 107 et 1237 à 1287), un domaine « kétosynthase » (KS) (acides aminés 119 à 543), un domaine « acyl transférase » (AT) (acides aminés 640 à 1045), et un domaine « thioestérase »  
15 (TE) (acides aminés 1464 à 1543).

Des orthologues de ML1229 et Pks13 ont été recherchés chez différentes espèces en utilisant le programme BLAST (ALTSCHUL et al., Nucleic Acid Res. 25 : 3389-3402, 1997). Les séquences de différentes condensases  
20 putatives Pks13 codées par le gène *pks13*, « acyl-CoA synthase » FadD32 et « sous-unité de l'acyl-CoA carboxylase » AccD4 (codées respectivement par deux gènes *fadD32* et *accD4* flanquant le gène *pks13* chez toutes les corynébactéries et mycobactéries analysées, comme illustré  
25 dans la Figure 2), ont été comparées en utilisant le programme Needleman-Wunsh disponible sur le site web de l'Institut Pasteur <http://www.pasteur.fr>.

Aucun orthologue de ML1229 n'a été identifié chez trois espèces de corynébactéries (*C. glutamicum*, *C.*  
30 *efficiens* et *C. diptheriae*) alors que des orthologues de Pks13 (ML0101) ont été retrouvés chez les trois espèces de corynébactéries susmentionnées et chez trois autres espèces de mycobactéries (*M. smegmatis*, *M. marinum* et *M. avium*). Ces protéines Pks13 contiennent les domaines  
35 catalytiques requis pour la condensation conduisant à la synthèse de l'acide mycolique, et les gènes correspondants sont localisés en aval de gènes connus pour leur



implication dans le transfert de l'acide mycolique sur l'arabinogalactane (PUECH et al., Mol. Microbiol. 44 : 1109-1122, 2002). Les identités des séquences des protéines Pks13 par rapport à la séquence complète de la Pks13 de *M. tuberculosis* sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1

<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. avium</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>C. efficiens</i>	<i>C. diptheriae</i>
FadD32	93%	75%	93%	83%	40%	42%	42%
<b>Pks13</b>	<b>83%</b>	<b>71%</b>	<b>84%</b>	<b>81%</b>	<b>44%</b>	<b>43%</b>	<b>44%</b>
AccD4	91%	81%	85%	80%	54%	52%	53%

La présence de Pks13 a également été mise en évidence dans d'autres espèces bactériennes produisant des acides mycoliques, en amplifiant par PCR un fragment interne de 1 kb de *pks13* à partir du génome de *Nocardia asteroides* ATCC19243, *Rhodococcus rhodochrous* ATCC13808 et *Tsukamurella paurometabolum* CIP100753T, en utilisant les amorces dégénérées suivantes :

15 *pks13a* : 5'-GCTGGARCTVACVTGGGARGC-3' (SEQ ID NO : 3)  
*pks13b* : 5'-GTGSGCGTTGGYDCCRAAVCCGAA-3' (SEQ ID NO : 4)

Les conditions de PCR sont : 2,5 unités de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO), 1 mM de dNTP et 4 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 58°C, 1 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C. Pour *T. paurometabolum*, les étapes à 58°C sont remplacées par des étapes à 50°C.

Les séquences de ces fragments présentent 40% d'identité sur toute leur longueur avec la Pks13 de *M.*

*tuberculosis*, suggérant également la présence de *pks13* chez ces bactéries.

L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine Pks13 est retrouvée chez toutes les mycolatas produisant des acides mycoliques, et que parmi les Pks de type I, elle est la seule enzyme susceptible de catalyser la condensation des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  d'acides gras pour former les acides mycoliques.

**EXEMPLE 2 : CLONAGE, SUREXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES PKS13 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM**

**Construction des plasmides**

La souche de *C. glutamicum* ATCC13032 (DUSCH et al., Appl. Environ. Microbiol. 65 : 1530-1539, 1999) est mise en culture sur un milieu BHI (DIFCO). La souche de *M. tuberculosis* H37Rv est mise en culture sur un milieu liquide Middlebrook 7H9 (DIFCO) additionné de 10% ADC (DIFCO) et de 0,05% Tween 80.

Les milieux de culture sont additionnés de kanamycine, d'hygromycine, de chloramphénicol et de sucrose quand nécessaire à une concentration finale de 40  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$  et 10% (p/v), respectivement.

L'ADN bactérien total est extrait à partir de 5 ml de cultures liquides saturées comme décrit dans BELISLE et al., 1998. Les culots d'ADN sont re-suspendus dans 100  $\mu\text{l}$  de Tris 10 mM (pH 8).

**Plasmides PWM35 et PWM36**

Le gène *pks13* de *M. tuberculosis* est amplifié par PCR à partir de l'ADN total de la souche H37Rv et des amorces 13Rtb 5'-GAGGACATATGGCTGACGTAGCGGAATC-3' (SEQ ID NO : 5) et 13Stb 5'-CGGTGAAAGCTTCTGCTTGCCCTACCTCACTTG-3' (SEQ ID NO : 6), avec 2,5 unités d'ADN polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France), 10% de diméthyl sulfoxyde ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), et 1  $\mu\text{M}$  de chaque amorce dans un volume final de 50  $\mu\text{l}$ , dans les conditions recommandées par le fournisseur (PROMEGA, Lyon, France). Le programme d'amplification

est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 57°C, 5 min à 72°C, puis 10 min à 72°C. Le produit d'amplification est purifié en utilisant le kit Qiaquick (QIAGEN, Courtaboeuf, France), puis digéré avec les enzymes de restriction *NdeI/HindIII*. Le fragment obtenu est inséré dans le vecteur pET26b (NOVAGEN), lui-même coupé avec les enzymes de restriction *NdeI/HindIII*. Le plasmide résultant, dénommé pWM35, contient le gène *pks13* fusionné en 3' du gène à une étiquette formée de 18 nucléotides codant pour une séquence de 6 histidines.

Le gène *pks13* de *M. tuberculosis* est amplifié par PCR à partir de l'ADN total de la souche H37Rv et des amorces 13Rtb 5'-GAGGACATATGGCTGACGTAGCGGAATC-3' (SEQ ID NO : 5) et 13Ttb 5'-GCTCGGGGATCCTCACTGCTTGCTACCTCAC-3' (SEQ ID NO : 7), dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le produit d'amplification est purifié comme décrit ci-dessus puis digéré avec les enzymes de restriction *NdeI/BamHI*. Le fragment obtenu est inséré dans le vecteur pET15b (NOVAGEN) préalablement coupé avec les enzymes de restriction *NdeI/BamHI*. Le plasmide résultant, pWM36, possède le gène *pks13* fusionné en 5' du gène à une étiquette de 18 nucléotides codant pour une séquence de 6 histidines.

#### Plasmide pWM38

Le gène *pks13* de *C. glutamicum* ATCC13032 est amplifié par PCR à partir de l'ADN total de cette souche et des amorces 13Ccg 5'-AATATGACTAGTAGCCAATCGTCGGATCAGAAG-3' (SEQ ID NO : 8) et 13Dcg 5'-AGCTCTAGATCTCTAATTCTTCCGAGAAATCTCAT-3' (SEQ ID NO : 9), dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le produit d'amplification est purifié comme précédemment puis digéré avec les enzymes de restriction *SpeI/BglII*. Le fragment obtenu est inséré dans le vecteur pET15b modifié par insertion d'un site *SpeI* à la place du site *XhoI*, puis coupé avec les enzymes de restriction *SpeI/BamHI*. Le plasmide résultant, pWM38, possède le gène *pks13* de *C.*

*glutamicum* fusionné à une étiquette de 18 nucléotides en 5' du gène codant pour une séquence de 6 histidines.

Surexpression des protéines Pks13 de *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum* chez *Escherichia coli*

Les plasmides pWM35, pWM36 et pWM38 sont transférés dans la souche d'*Escherichia coli* BL21 (DE3):pLysS (NOVAGEN).

Les trois souches sont inoculées dans 3 ml de milieu LB contenant du chloramphénicol (30 µg/ml) et de la kanamycine (40 µg/ml) ou de l'ampicilline (100 µg/ml) en fonction des plasmides. Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation (250 tr/min) jusqu'à saturation.

Une dilution au 1/100<sup>ème</sup> de ces cultures est réalisée dans 200 ml de milieu LB contenant de la kanamycine ou de l'ampicilline. Ces nouvelles cultures sont incubées sous agitation à 37°C pendant 2h30 (DO<sub>600nm</sub> = 0,7-0,8). De l'isopropyl-thio-β-D-galactoside (IPTG) est ajouté à une concentration finale de 0,5 mM et la culture est incubée 3h à 30°C sous agitation.

Purification des protéines Pks13 de *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum*

Les cellules exprimant les différentes protéines Pks13 sont culottées par centrifugation à 2500 g pendant 15 min, puis reprises dans 40 ml de tampon de charge (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, Imidazole 5 mM, NaCl 300 mM). Les cellules sont congelées à -20°C pendant 15h, puis elles subissent 3 cycles de décongélation-congélation dans l'azote liquide. Elles sont ensuite soniquées 3 fois pendant 30 sec (Vibra-cell, BIOBLOCK SCIENTIFIC) (50% cycle actif et puissance de sortie 5), puis centrifugées pendant 30 min à 20000 g.

Le surnageant est filtré sur microfiltre (diamètre des pores : 0,2 µm) puis chargé sur une colonne « Chelating Sepharose Fast Flow » (AMERSHAM) en FPLC (BIORAD HP duoflow). La protéine est éluée par gradient de

5 à 150 mM d'Imidazole avec un pic d'élution à 90 mM. Les fractions enrichies en protéines sont mélangées, concentrées par filtration sur centripep 30 (AMICON), et la protéine est séparée des contaminants résiduels par chromatographie d'exclusion (S-200 16/60 mm, AMERSHAM) en FPLC.

En suivant cette procédure, environ 20 mg de protéines Pks13 de *M. tuberculosis* ou de *C. glutamicum* sont obtenus.

### 10 EXEMPLE 3 : ANALYSE BIOCHIMIQUE DE MUTANTS $\Delta pks13$ DE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ET MYCOBACTERIUM SMEGMATIS

La souche de *C. glutamicum* ATCC13032 est mise en culture comme précédemment décrit.

15 La souche de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 de type sauvage (SNAPPER et al., Mol. Microbiol. 4 : 1911-1919, 1990) est mise en culture sur un milieu LB (DIFCO) supplémenté par 0,05% de Tween 80 afin d'éviter l'agrégation.

20 Les milieux de culture sont additionnés de kanamycine, d'hygromycine, de chloramphénicol et de sucrose quand nécessaire à une concentration finale de 40 µg/ml, 50 µg/ml, 15 µg/ml et 10% (p/v), respectivement.

L'ADN bactérien total est extrait à partir de 5 ml de culture liquide saturée comme décrit dans BELISLE et al., 1998. Le culot d'ADN est re-suspendu dans 100 µl de Tris 10 mM (pH 8).

### Construction d'un mutant de *C. glutamicum*

#### Souche mutante $\Delta pks13$ de *C. glutamicum*

30 Deux fragments d'ADN de 0,9 kb et 0,7 kb chevauchant le gène *pks13* sur ses extrémité 5' et 3' sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN total de *C. glutamicum* en utilisant respectivement les couples d'amorces suivants :

pkdel5 : 5'-GAAATCTCGAGCCACGGCGAAA-3' (Tm=54°C)  
35 (SEQ ID NO : 10)

pkdel2 : 5'-ACGATTGCCGCGGTTCCATATTG-3' (Tm=54°C)

(SEQ ID NO : 11)

et

pkdel13: 5'-CATCCTGTTCCGCGGAACGCATGC-3' (Tm=54°C)

(SEQ ID NO : 12)

5 pkdel14: 5'-CAGCATGATGGAGATCTGAGGGC-3' (Tm=54°C)

(SEQ ID NO : 13)

Les conditions de PCR sont : 1 unité de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP et 0,5 µM de chaque amorce dans un volume  
10 final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 2 min à 94°C, puis 35 cycles de 1 min à 94°C, 30 sec à 54°C, 1 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C.

15 Ces fragments sont insérés dans le plasmide pMCS5 (MOBITEC, Göttingen, Allemagne). Une cassette de résistance à la kanamycine est insérée entre ces deux fragments PCR pour donner le plasmide pCMS5::pks. Ce plasmide est transféré dans la souche *C. glutamicum* et les  
20 transformants sont sélectionnés sur un milieu gélosé contenant de la kanamycine.

La Figure 3A présente schématiquement la structure génétique du locus *pks13* dans la souche de type sauvage (WT) et dans la souche mutante  $\Delta pks13$  de *C.*  
25 *glutamicum*. Dans cette dernière, l'allèle de type sauvage de *pks13* présent sur le chromosome est remplacé par un allèle muté contenant une délétion interne de 4,3 kb dans laquelle le gène *km* codant pour la kanamycine est inséré. Les boîtes indiquent les différents gènes du locus *pks13*.  
30 La localisation et le nom des amorces utilisées pour l'analyse par PCR des souches mutantes sont indiqués par des têtes de flèche. Les produits d'amplification PCR attendus pour les différentes souches sont indiqués sous chaque structure génétique.

35 Les transformants  $\Delta pks13$  dans lesquels le remplacement allélique est intervenu entre le gène *pks13*

chromosomique de type sauvage et l'allèle plasmidique muté présentent (1) un changement de morphologie des colonies passant d'un aspect brillant lisse à rugueux (2) une courbe de croissance considérablement diminuée (doublement du temps de division) par rapport au type sauvage (3) une thermosensibilité qui les rend incapables de croître à des températures supérieures à 30°C contrairement au type sauvage qui produit des colonies sur milieu gélosé jusqu'à 37°C (4) une forte agrégation en culture liquide en absence de détergent.

Ces transformants sont caractérisés par PCR en utilisant les amorces suivantes :

fa2 : 5'-TCTGACCACCTTCCGTGAAGC-3' (Tm=55°C ou 62°C)  
(SEQ ID NO : 14)  
ac2 : 5'-GAACGAGTTCAGAGCTTC-3' (Tm=55°C ou 62°C)  
(SEQ ID NO : 15)  
K10 : 5'-TATTTCTGAATGGTTCGCTGGGTTTATC-3' (Tm=55°C)  
(SEQ ID NO : 16)  
K7 : 5'-TAAAAAGCTTATCGATACCG-3' (Tm=55°C)  
(SEQ ID NO : 17)  
pk1 : 5'-GCCGTGACGGTATCTCGG-3' (Tm=55°C)  
(SEQ ID NO: 18)  
pk2 : 5'-CCAGGGCAGTTGCTTCAATG-3' (Tm=55°C)  
(SEQ ID NO: 19)

La Figure 3B présente les résultats d'analyse par PCR du mutant *Δpks13* et de la souche de type sauvage (WT) de *C. glutamicum*.

**Souche mutante *Δpks13*:pCGL2308 de *C. glutamicum***

Un plasmide de complémentation, pCGL2308, est produit par l'insertion dans le vecteur pCGL482 (PEYRET et al., Mol. Microbiol. 9 : 97-109, 1993) d'un fragment de 5,3 kb de *C. glutamicum*, comprenant le gène *pks13* et la région de 417 pb en amont de ce gène, obtenu par PCR à partir de l'ADN total de *C. glutamicum* en utilisant le couple d'amorces suivant :

pk3 : 5'-TCCGGAAAGATCTCACGCCGCG-3' (Tm=62°C)

(SEQ ID NO : 20)

pk4 : 5'-GCGTGCGCGCAGATCTGCTAGC-3' (Tm=62°C)

(SEQ ID NO : 21)

5 Le plasmide pCGL2308 résultant est transféré par électroporation dans la souche *Δpks13* de *C. glutamicum* et les transformants *Δpks13*:pCGL2308 sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de la kanamycine.

10 Les transformants *Δpks13*:pCGL2308 présentent une morphologie brillante et lisse, une vitesse de croissance intermédiaire entre la souche sauvage et la souche mutante, une incapacité à pousser à des températures supérieures à 32°C (alors que la souche sauvage pousse à 37°C), ainsi qu'une teneur en acide mycolique beaucoup plus faible que celle de la souche  
15 sauvage.

Il apparaît donc que la complémentation par le plasmide induit une réversion partielle vers le phénotype sauvage.

#### Construction d'un mutant conditionnel de *M. smegmatis*

##### 20 Souche mutante PMM47 de *M. smegmatis*

Deux fragments d'ADN d'environ 1 kb chevauchant le gène *pks13* sur ses extrémités 5' et 3' sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN total de *M. smegmatis* en utilisant respectivement les couples d'amorces  
25 suivants :

13F : 5'-GCTCTAGAGTTTAAACGCTGGACCTGTCCAACGTCAAGG-3'

(SEQ ID NO : 22)

13G : 5'-GGACTAGTCGTCGAAACCGACCGTCACCAG-3'

(SEQ ID NO : 23)

30 et

13H : 5'-GGACTAGTCGGCATCTTCAACGAGTTGC-3'

(SEQ ID NO : 24)

13I : 5'-CCCAAGCTTGTTTAAACTTGTCGAAGTGGTTCGACGG-3'

(SEQ ID NO : 25)

35 Les conditions de PCR sont : 3 unités de polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France), 10% de diméthyl



sulfoxyde ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), 1 mM de dNTP et 1  $\mu\text{M}$  de chaque amorce dans un volume final de 50  $\mu\text{l}$ , dans les conditions recommandées par le fournisseur (PROMEGA, Lyon, France). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 58°C, 3 min à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C.

Ces fragments sont insérés dans le plasmide pJQ200 (QUANDT et al., Gene 127 : 15-21, 1993). Une cassette de résistance à l'hygromycine est insérée entre ces deux fragments PCR pour donner le plasmide pDP28. Ce plasmide non réplcatif contenant le marqueur *sacB* et une copie de l'allèle muté *pks13::hyg* est transféré dans la souche *M. smegmatis* par électroporation et les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de l'hygromycine.

Les transformants ayant intégré le plasmide pDP28 par simple recombinaison entre les copies du type sauvage et muté du gène *pks13* sont caractérisés par PCR en utilisant les amorces suivantes :

13J : 5'-CTTCCACGACATGGTCTGAT-3' (SEQ ID NO : 26)  
13K : 5'-CACGATCGAGTCGAGCTCGA-3' (SEQ ID NO : 27)  
H1 : 5'-AGCACCAGCGGTTCGCCGT-3' (SEQ ID NO : 28)  
H2 : 5'-TGCACGACTTCGAGGTGTTTCG-3' (SEQ ID NO : 29)

Les conditions de PCR sont : 2,5 unités de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 10% de diméthyl sulfoxyde ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), 1 mM de dNTP et 1  $\mu\text{M}$  de chaque amorce dans un volume final de 50  $\mu\text{l}$ , dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 62°C, 2 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C. Une souche dénommée PMM47 de *M. smegmatis* est sélectionnée, dans laquelle le plasmide pDP28 s'est inséré au locus *pks13* par simple recombinaison. Des étalements à différentes températures (25°C, 32°C ou 37°C) d'une culture de PMM47, sur un milieu contenant 10% de sucrose et de l'hygromycine produit des clones avec une mutation dans le gène *sacB*

mais aucun événement de seconde recombinaison pouvant produire une souche portant seulement l'allèle muté *pks13::hyg* n'est sélectionné.

5 Ce résultat indique que le gène *pks13* est essentiel pour la croissance des mycobactéries. Afin de confirmer cette hypothèse, une seconde copie du gène *pks13* de type sauvage est transférée dans PMM47 clonée sur un vecteur mycobactérien thermosensible.

**Souche mutante thermosensible PMM48:pDP32 de *M. smegmatis***

10 Pour produire le plasmide de complémentation pDP32, le gène *pks13* est amplifié par PCR à partir de l'ADN total de *M. smegmatis* en utilisant les amorces 13R 5'-ATGAGATCTGATGAAAACCACAGCGAT-3' (SEQ ID NO : 30) et 13P 5'-GGACTAGTCTTGCGACGGCCTTCTCAC-3' (SEQ ID NO : 31).

15 Les conditions de PCR sont : 3 unités d'ADN polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO), 1 mM de DNTP, et 1 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (PROMEGA, Lyon, France).  
20 Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 58°C, 5 min à 72°C, puis 10 min à 72°C.

Le gène *pks13* est inséré dans un plasmide mycobactérien thermosensible dérivé du plasmide pCG63  
25 (GUILHOT et al., FEMS Microbiol. Letter 98 : 181-186, 1992) et contenant une cassette d'expression mycobactérienne, avec un promoteur mycobactérien, pBlaF\*, en amont d'un site multiple de clonage lui-même en amont d'un terminateur de transcription (LE DANTEC et al., J.  
30 Bacteriol. 183 : 2157-2164, 2001). Le plasmide pDP32 résultant est transféré par électroporation dans la souche PMM47 de *M. smegmatis* et les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de la kanamycine et de l'hygromycine. La seconde recombinaison au locus  
35 chromosomique *pks13* est sélectionnée par étalement d'une culture liquide de ces transformants à 30°C sur milieu

gélisé contenant de la kanamycine, de l'hygromycine et du sucrose à 30°C. Les colonies sont criblées par PCR en utilisant les amorces suivantes :

13J : 5'-CTTCCACGACATGGTCTGAT-3' (SEQ ID NO : 26)

5 13K : 5'-CACGATCGAGTCGAGCTCGA-3' (SEQ ID NO : 27)

H1 : 5'-AGCACCAGCGGTTCCGCGT-3' (SEQ ID NO : 28)

H2 : 5'-TGCACGACTTCGAGGTGTTTCG-3' (SEQ ID NO : 29)

Les conditions de PCR sont : 2,5 unités de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO), 1 mM de dNTP et 1 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 62°C, 2 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C.

La Figure 4A présente schématiquement la structure génétique du locus *pks13* obtenu au cours de la construction du mutant conditionnel PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*. Les boîtes indiquent les différents gènes du locus *pks13*. La localisation et le nom des amorces utilisées pour l'analyse par PCR des souches mutantes sont indiqués par des têtes de flèche. Les produits d'amplification PCR attendus pour les différentes souches sont indiqués sous chaque structure génétique.

La Figure 4B présente les résultats d'analyse par PCR du mutant conditionnel PMM48:pDP32 de *M. smegmatis* et de ses souches parentales PMM47 et mc<sup>2</sup>155 (WT).

En utilisant ces conditions, 8% des colonies sélectionnées Hyg<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, Suc<sup>R</sup> sont le résultat d'un échange allélique ; les autres clones étant le résultat d'une mutation du gène *sacB*.

La souche dénommée PMM48:pDP32, dans laquelle la copie chromosomique de type sauvage du gène *pks13* est remplacée par l'allèle muté *pks::hyg* et une copie du gène *pks13* fonctionnelle se trouve sur un plasmide thermosensible, est sélectionnée pour une analyse

phénotypique. Les résultats sont représentés dans la Figure 4C.

Légende de la Figure 4C :

□ = souche recombinante PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*

5 ♦ = souche de type sauvage (WT)

Des étalements de cette souche recombinante sur milieu gélosé contenant de l'hygromycine à 32°C ou 42°C révèlent qu'elle est incapable de former des colonies à température élevée. En culture liquide à 32°C, cette  
10 souche croît aussi vite que la souche de type sauvage, une température permissive pour le plasmide pDP32. Cependant, lorsque la culture est placée à 42°C, une température non permissive pour le plasmide pDP32, le nombre de bactéries viables augmente jusqu'au temps 12h à 24h post-  
15 inoculation, puis demeure stable au cours des 24 heures suivantes avant de décroître ; les seules bactéries viables sont celles qui ont conservé une copie du plasmide de complémentation.

Ces résultats montrent que le gène *pks13* est  
20 essentiel pour la survie de *M. smegmatis*, comme attendu d'un gène codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques.

**Analyse biochimique des mutants  $\Delta$ *pks13* de *C. glutamicum* et PMM48:pDP32 de *M. smegmatis***

25 **Protocole d'analyse**

Les souches de *C. glutamicum* sont mises en culture jusqu'en phase exponentielle et marquées avec de l'acétate [<sup>14</sup>C] 0,5 µCi/ml (activité spécifique de 54 mCi/mmol ; ICN, Orsay, France) pendant 3h. Pour le  
30 radiomarquage du mutant conditionnel de *M. smegmatis* à température non permissive, PMM48:pDP32 et la souche de type sauvage mc<sup>2</sup>155 sont mises en culture à 30°C. Ces cultures sont ensuite diluées dans du milieu frais à une DO<sub>600nm</sub> = 0,005 et incubées à 42°C jusqu'à une DO<sub>600nm</sub> = 0,3.  
35 Les cellules sont ensuite marquées pendant 3h avec de l'acétate [<sup>14</sup>C] 0,5 µCi/ml.

Les acides gras sont préparés à partir des cellules marquées et séparés par chromatographie sur couche mince sur Durasil 25 en utilisant du dichlorométhane ou un mélange éther/diéthyléther (9:1) comme éluant comme décrit dans LAVAL et al. (Anal. Chem. 73 : 4537-4544, 2001). Les composés marqués sont quantifiés sur un Phosphomalger (AMERSHAM BIOSCIENCES).

Pour les analyses par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une analyse par spectromètre de masse (GC-MS), des dérivés triméthylsilyl d'acides gras sont obtenus comme décrit dans CONSTANT et al. (J. Biol. Chem. 277 : 38148-38158, 2002) et analysés sur un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5889 X (énergie d'électron, 70eV) travaillant en modes capture électronique (EI) en utilisant du NH<sub>3</sub> comme gaz de réaction (Cl/NH<sub>3</sub>), couplé avec un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890 series II associé à une colonne OV1 similaire (0,30 mm x 12 m).

## Résultats

### 20 Mutants *Δpks13* et *Δpks13:pCGL2308* de *C. glutamicum*

La Figure 3C illustre le résultat de l'analyse des acides gras libérés après saponification à partir de la souche de type sauvage (WT) et des mutants *Δpks13* et *Δpks13:pCGL2308* de *C. glutamicum*. L'analyse par chromatographie sur couche mince de ces produits révèle que les spots correspondant aux acides mycoliques ou à la palmitone, un produit de dégradation de l'intermédiaire β-céto acyle résultant de la réaction de condensation, ne sont plus détectables chez les mutants. Cette observation est confirmée par l'analyse en GC-MS qui démontre que le mutant *Δpks13* de *C. glutamicum* ne synthétise plus d'acides mycoliques mais produit une quantité similaire d'acides gras C16-C18, le précurseur de mycolate, de celle de la souche de type sauvage (données non représentées). Cette production d'acides mycoliques est partiellement restaurée suite au transfert dans la souche mutante *Δpks13* d'un

plasmide portant le gène *pks13* fonctionnel de *C. glutamicum* ; ce qui démontre que ces phénotypes sont effectivement dus à la délétion de *pks13*. La restauration partielle suggère soit que l'expression de *pks13* par le  
5 plasmide n'est pas du même niveau que celle dans la souche de type sauvage, soit que l'insertion chromosomique de la cassette kanamycine exerce un effet polaire sur l'expression du gène *accD4*, ou les deux.

En outre, dans les Mycolatas, les acides  
10 mycoliques sont supposés contribuer à la bicouche lipidique qui forme un homologue fonctionnel à la membrane externe des bactéries Gram-négative. Chez les corynébactéries et les mycobactéries, un plan de cryofracture se propage entre les deux couches de cette  
15 pseudo membrane externe. Comme attendu, la Figure 3D montre la perte de ce plan de fracture dans la souche mutant  $\Delta pks13$  de *C. glutamicum* alors qu'il est clairement visible dans la souche de type sauvage, ce qui suggère que la bicouche lipidique composée majoritairement d'acides  
20 mycoliques n'est plus présente dans le mutant.

Ces résultats montrent que le mutant  $\Delta pks13$  de *C. glutamicum* est bien dépourvu d'une enzyme essentielle dans la biosynthèse les acides mycoliques.

#### Mutant PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*

25 La Figure 4D illustre le résultat de l'analyse des acides gras libérés après saponification à partir de la souche de type sauvage de *M. smegmatis* et du mutant conditionnel PMM48:pDP32, après croissance à température permissive (30°C) ou non permissive (42°C). Le rapport  
30 mycolates/acides gras à chaîne courte est quantifié pour le mutant PMM48:pDP32 et divisé par celui obtenu pour la souche de type sauvage cultivée dans les mêmes conditions. Le graphe montre qu'après transfert à 42°C, le contenu moyen en mycolate dans le mutant PMM48:pDP32 est diminué  
35 de plus de 60%. Comme attendu, cette synthèse n'est pas complètement stoppée dans la culture du fait que la

population bactérienne restante conservant le plasmide de complémentation non réplcatif produit des acides mycoliques.

Ces résultats montrent que le gène *pks13* est impliqué dans la biosynthèse des acides mycoliques chez *M. smegmatis*.

#### EXEMPLE 4 : CRIBLAGE D'ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LES MYCOLATAS

##### Criblage de xénobiotiques inhibant la condensation par la Pks13, directement ou indirectement

Comme illustré à la figure 5, la Pks13 permet la condensation de deux substrats, qui résultent eux-mêmes de deux réactions indépendantes.

L'absence d'acides mycoliques dans des mycolatas peut donc provenir de l'inhibition de la Pks13 et/ou de l'inhibition de la FadD32, et/ou de l'inhibition du complexe carboxylase dans lequel intervient la protéine AccD4.

Plusieurs tests permettent de cribler l'action d'un xénobiotique sur la synthèse des acides mycoliques par les mycolatas.

Comme vu à l'exemple 3 ci-dessus, les transformants  $\Delta pks13$  dans lesquels le gène *pks13* a été inactivé présentent un changement de morphologie des colonies, qui passent d'un aspect brillant lisse à un aspect rugueux. Ceci est également le cas pour des bactéries *C. glutamicum* dans lesquelles le gène *accD4* ou *fadD32* est muté (voir la figure 6). Un premier test pour déterminer l'impact d'un xénobiotique sur la synthèse des acides mycoliques consiste donc à étaler des mycolatas capables de survivre sans produire d'acides mycoliques, par exemple des bactéries *C. glutamicum* (par exemple, la souche ATCC13032), sur un milieu de culture gélosé contenant le xénobiotique à tester. L'observation visuelle des colonies obtenues permet d'identifier les antibiotiques potentiels.

Un autre test consiste à faire pousser des bactéries *C. glutamicum* en milieu liquide, tel que décrit ci-dessus, en présence ou en absence du xénobiotique à tester. De l'acétate [ $^{14}\text{C}$ ] 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$  (activité spécifique de 54 mCi/mmol ; ICN, Orsay, France) est ajouté pendant la phase exponentielle de croissance, pendant au moins 3 heures, avant de faire l'analyse biochimique des acides gras contenus dans les bactéries par chromatographie sur couche mince, comme décrit ci-dessus et dans Portevin et al, PNAS 2004, Vol.101, p314-319 (voir notamment le premier paragraphe de la page 316). Comme illustré à la figure 3C, il est possible de détecter les acides mycoliques synthétisés par la souche cultivée en l'absence du xénobiotique (témoin), ainsi que le palmitone, produit de dégradation résultant de la réaction de la condensation par la Pks13. Une altération de la fonction de la Pks13, et/ou de la FadD32, et/ou du complexe carboxylase, liée à la présence du xénobiotique, entraînera une diminution, voire une disparition, des bandes correspondant.

Bien évidemment, un xénobiotique identifié selon un des deux tests décrits ci-dessus peut ensuite être testé pour son aptitude à inhiber la croissance des mycolatas incapables de survivre sans produire des acides mycoliques, telles que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*.

#### Détermination de l'étape de la synthèse des acides mycoliques effectivement inhibée par le xénobiotique

Une deuxième étape d'analyse est nécessaire pour déterminer plus finement la cible d'un xénobiotique inhibant la synthèse des acides mycoliques, c'est-à dire pour déterminer s'il agit sur la Pks13 ou sur une enzyme impliquée dans l'activation d'un de ses substrats.

Ceci peut être effectué en analysant les acides gras présents dans les bactéries *C. glutamicum* cultivées en présence du xénobiotique (candidat



antibiotique), par exemple par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une spectrométrie de masse (GC-MS).

Pour cela, des esters méthylés d'acides gras peuvent être obtenus par saponification des cellules, suivie par une méthylation avec du diazométhane, comme cela est décrit par Laval et al (Annal. Chem., 2001, Vol. 73, p. 4537-4544). Ils sont ensuite fractionnés sur colonne Florisil irriguée avec de l'éther de pétrole contenant 0, 1, 2, 3 et 100% de diéthyléther. Les esters méthylés d'acides gras polaires sont contenus dans la dernière fraction éluée. Alternativement il est possible d'obtenir des dérivés triméthylsilylés par la méthode décrite par Constant et al (J. Biol. Chem. 2002, Vol. 277, p. 38148-38158).

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une spectrométrie de masse peuvent être effectuées comme décrit par Portevin et al (PNAS 2004, *supra*).

Ces analyses du contenu en acides gras des bactéries cultivées en présence et en absence du xénobiotique inhibant la synthèse des acides mycoliques permettent de déterminer si le xénobiotique agit sur la Pks13 ou la FadD32, ou sur l'acyl carboxylase contenant AccD4. L'inhibition de la condensation par la Pks13 ou de la formation d'acyl-AMP par FadD32 entraîne l'accumulation des intermédiaires résultant de la carboxylation par l'acyl-CoA carboxylase, tel que l'acide tétradécylmalonique. L'absence d'accumulation de ce composé indique que le xénobiotique agit sur la carboxylase contenant AccD4. Pour déterminer si le xénobiotique agit sur FadD32, un test peut être réalisé en purifiant la protéine FadD32 et en mesurant la formation d'acyl-AMP *in vitro*, comme décrit par Trivedi et al, (Nature 2004, Vol. 428, p. 441-445), en présence ou absence du xénobiotique. L'observation d'une absence de formation d'acyl-AMP en présence du xénobiotique indique

qu'il agit sur FadD32. Le résultat contraire indique que le xénobiotique agit sur la Pks13.

Une bactérie dont le gène Pks13 a été muté peut servir de contrôle pour vérifier l'accumulation de ces deux substrats. Pour cela, il est préférable d'inactiver le gène de la Pks13 par une mutation ponctuelle ou une délétion, plutôt qu'en introduisant une séquence étrangère dans le gène *pks13*, comme décrit ci-dessus. En effet, l'introduction de la cassette *km* dans le gène *pks13* est susceptible d'induire un défaut d'expression du gène *accD4* dans le mutant décrit ci-dessus. La comparaison de spectres obtenus avec (i) des bactéries *C. glutamicum* cultivées en l'absence du xénobiotique, (ii) ces mêmes bactéries, cultivées en présence du xénobiotique, (iii) des bactéries *C. glutamicum* comportant une mutation non-sens dans le gène *pks13*, et, le cas échéant, (iv) des bactéries *C. glutamicum* dont le gène *accD4* ou le gène *fadD32* a été muté, permet de déterminer si l'inhibition de la synthèse des acides mycoliques par le xénobiotique est liée à son action sur la Pks13, ou sur une enzyme située en amont dans la biosynthèse des acides mycoliques.

REVENDICATIONS

1) Protéine purifiée, caractérisée en ce que :

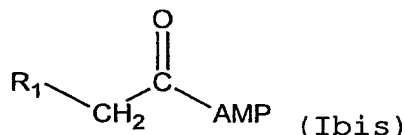
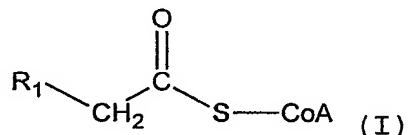
a) elle possède au moins 40% d'identité, sur la totalité de sa séquence, avec la protéine Pks13 de *M. tuberculosis* ;

b) elle possède un domaine acyl transférase (pfam00698), un domaine kétoacylsynthase (pfam02801 ou pfam00109), au moins un domaine acyl carrier protein (COG0331 ou COG0304,) et un domaine thioestérase (COG3319 ou pfam00975)

c) elle catalyse une condensation de Claisen ou malonique entre une molécule d'acyl-CoA ou d'acyl-AMP et une molécule d'acylmalonyl-CoA.

2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle catalyse une condensation de Claisen ou malonique entre :

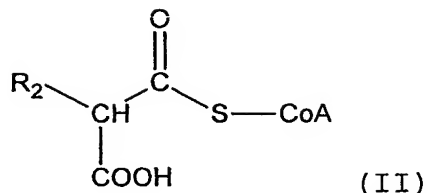
a) une molécule d'acyl-CoA de formule I, ou une molécule d'acyl-AMP de formule Ibis :



dans laquelle  $\text{R}_1$  est une chaîne comprenant de 6 à 68 atomes de carbone, pouvant comporter une ou plusieurs doubles liaisons  $\text{C}=\text{C}$ , et/ou un ou plusieurs cycles *cis/trans*-cyclopropane, et/ou un ou plusieurs groupes  $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ -\text{CH}-\text{O}-\text{C}- \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$  et/ou pouvant porter un ou plusieurs groupes latéraux choisis parmi  $-\text{CH}_3$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_3$  ;

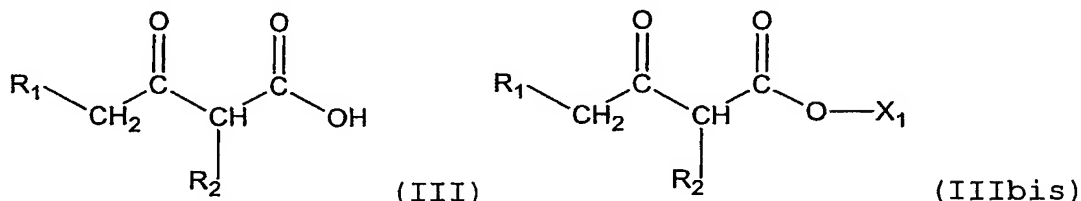
et

b) une molécule d'acylmalonyl-CoA de formule II :



dans laquelle  $\text{R}_2$  est un alcane linéaire comprenant de 10 à 24 atomes de carbone ;

pour former un intermédiaire  $\beta$ -céto acyle de  
 5 formule III, ou un  $\beta$ -céto ester de formule IIIbis :



dans laquelle  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  sont tels que définis ci-dessus, et  $\text{X}_1$  est une molécule acceptrice.

3) Protéine selon une quelconque des  
 10 revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente au moins 70% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1 de *Mycobacterium tuberculosis*.

4) Protéine selon une quelconque des  
 revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente  
 15 au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 2 de *Corynebacterium glutamicum*.

5) Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence polynucléotidique codant pour une protéine selon une quelconque des revendications 1 à  
 20 4.

6) Cellule-hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon la revendication 5.

7) Cellule-hôte selon la revendication 6,  
 25 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote.

8) Procédé d'obtention d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5       - la mise en culture d'une cellule hôte selon une quelconque des revendications 6 ou 7 ; et
- la purification de ladite protéine à partir de ladite culture.

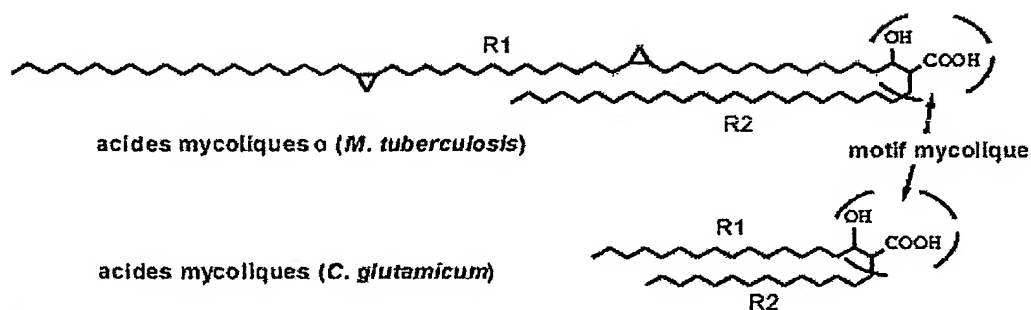
9) Procédé pour inhiber la biosynthèse de l'enveloppe des mycolatas, caractérisé en ce qu'il  
10 comprend l'inhibition, chez lesdites bactéries, de l'expression ou de l'activité d'une protéine selon une quelconque des revendications 1 à 4.

10) Utilisation d'une protéine selon une quelconque des revendications 1 à 4, pour le criblage  
15 d'antibiotiques actifs sur les mycolatas.

11) Utilisation selon la revendication 10, pour le criblage d'antibiotiques actifs sur les mycobactéries.

1/7

A)



B)

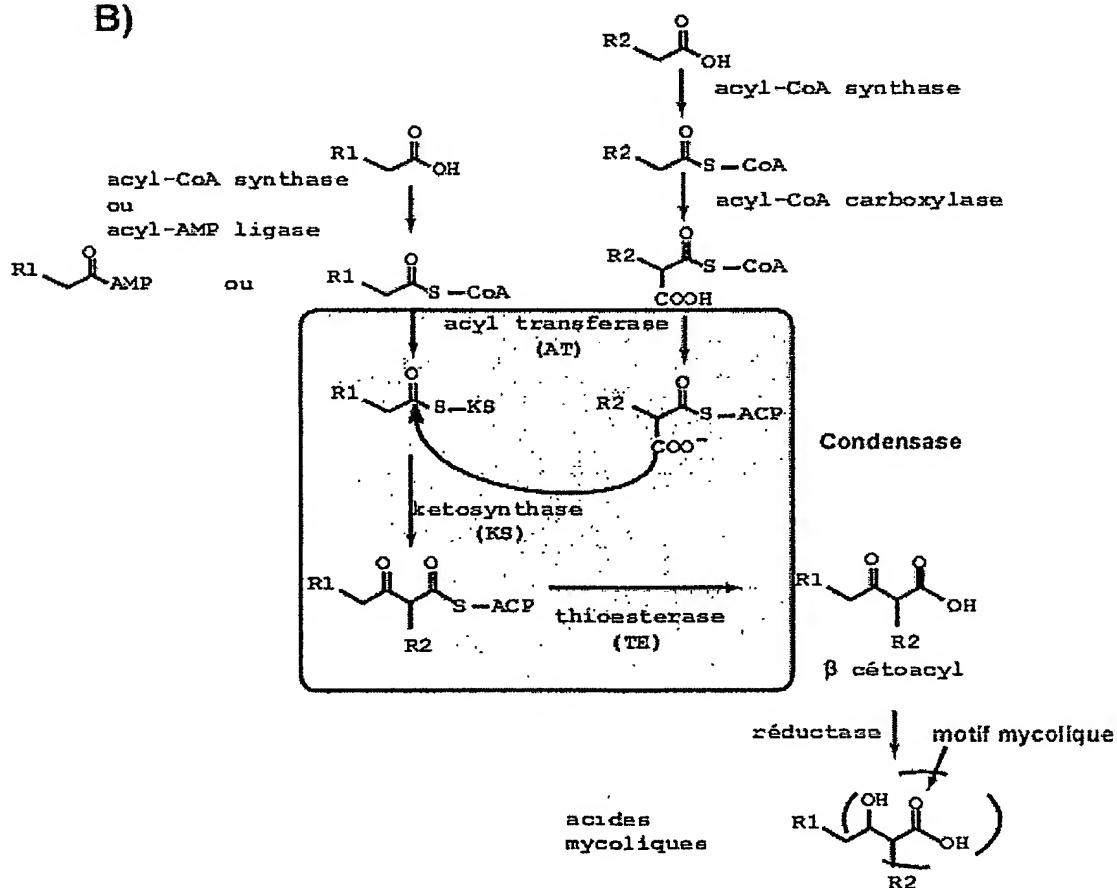


Fig. 1

2/7

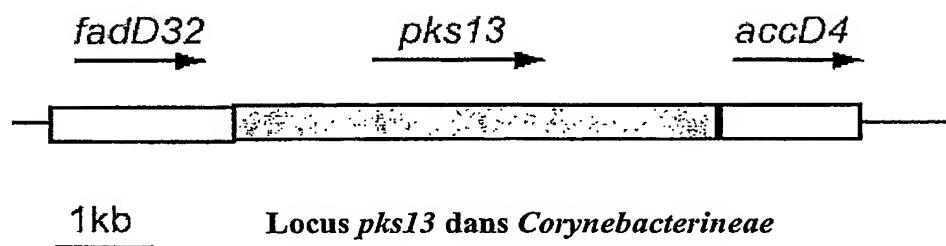
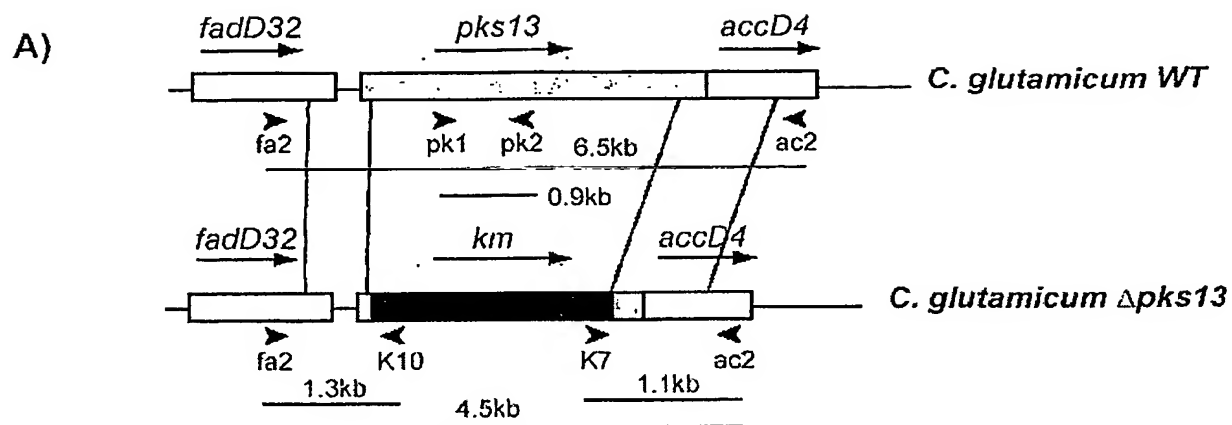


FIG. 2

3/7



B)

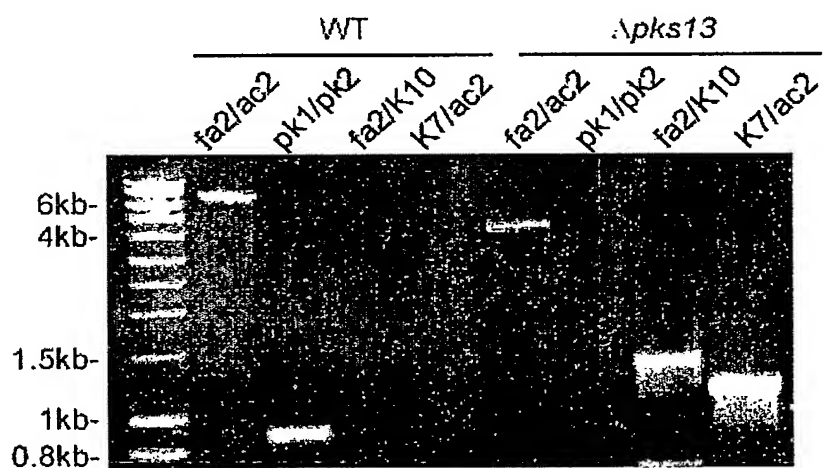
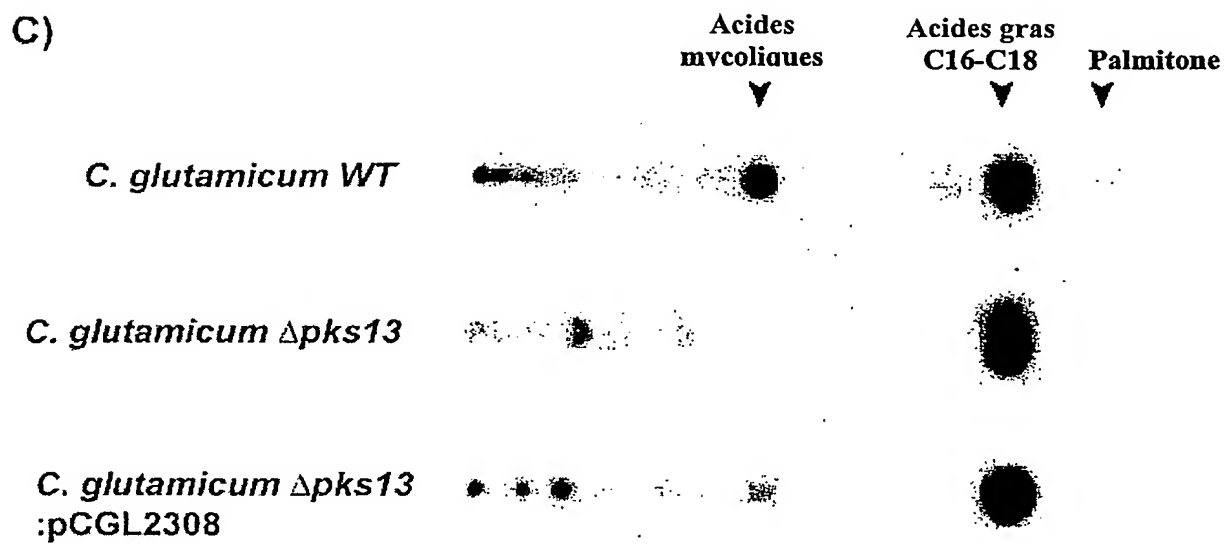


FIG. 3



4/7



D)

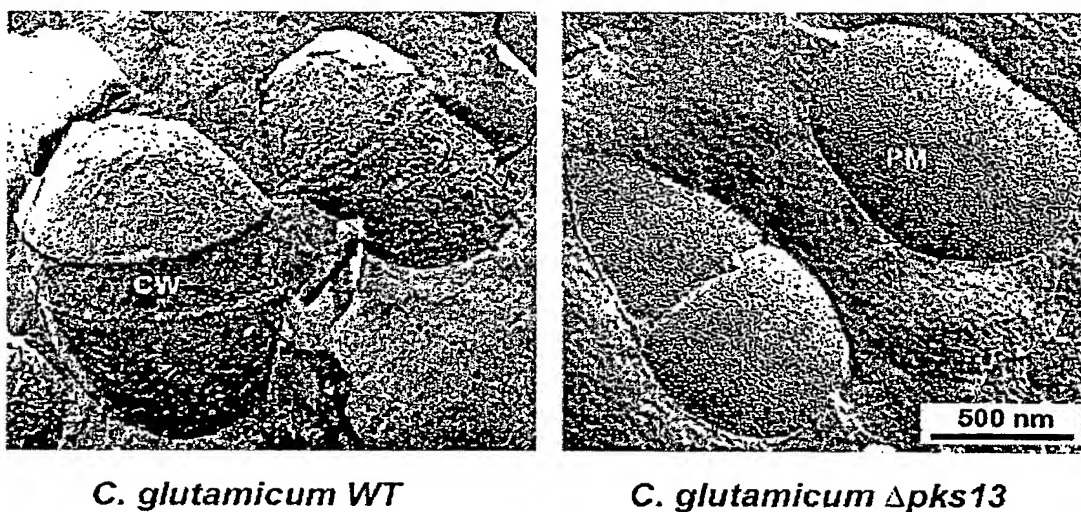


FIG.3 (suite)

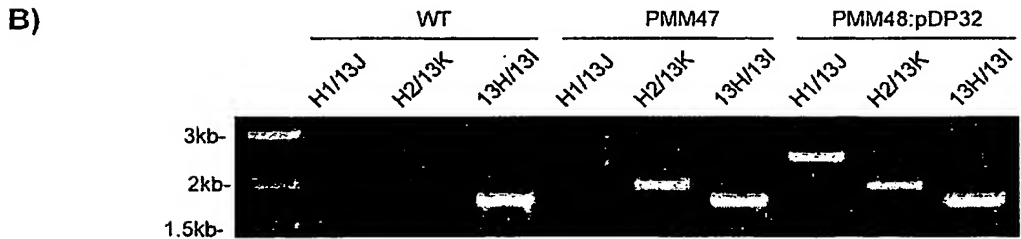
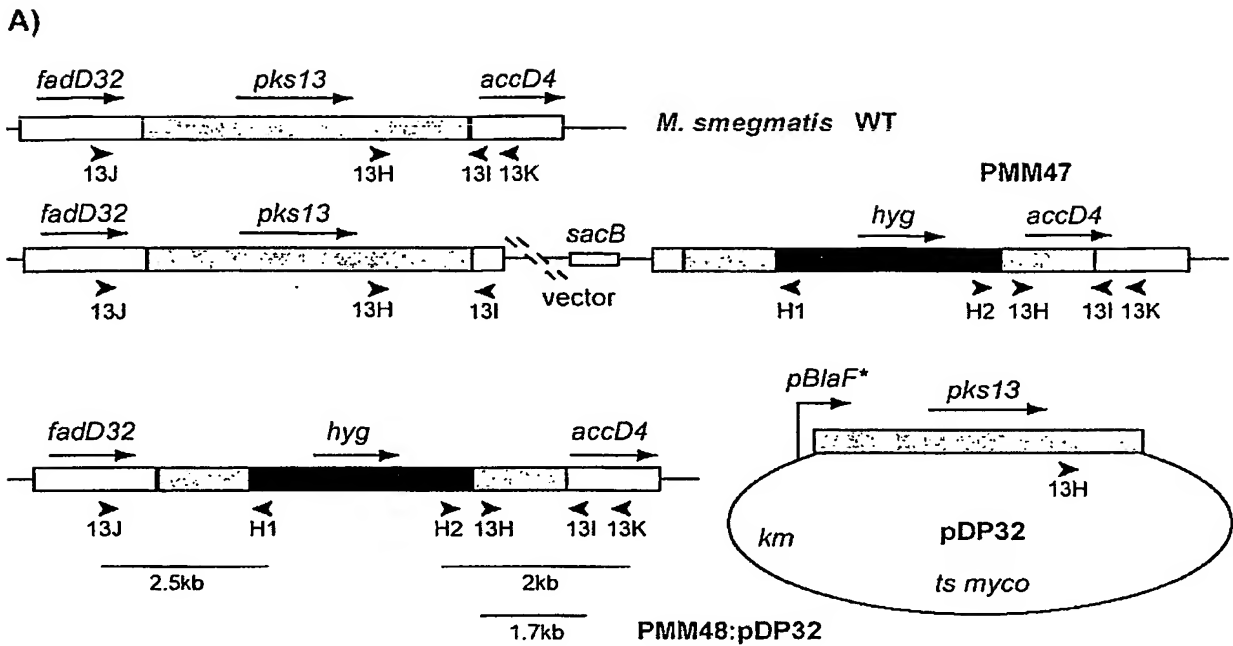
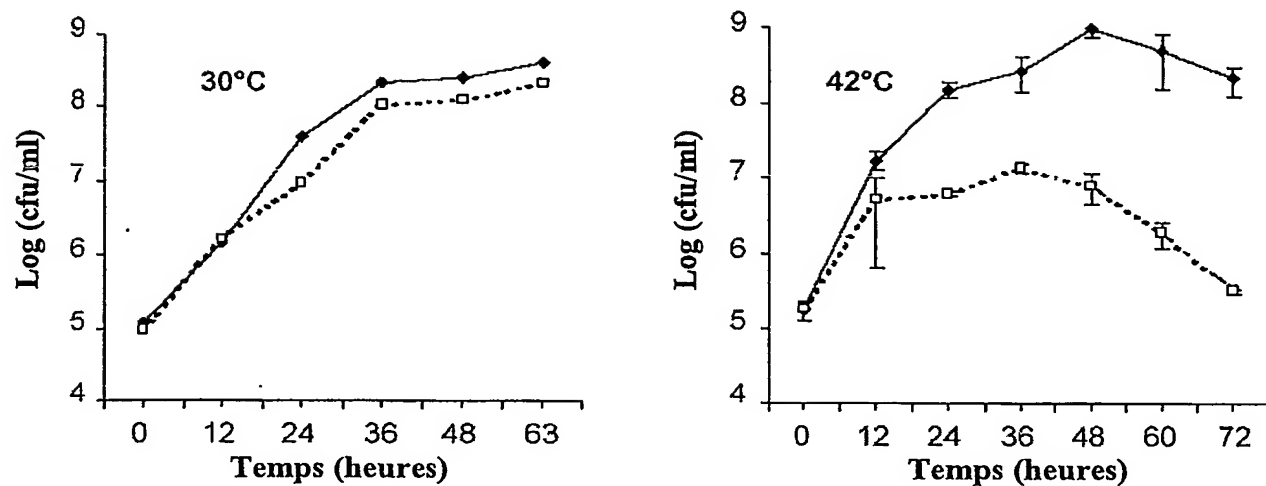


FIG. 4

6/7

C)



D)

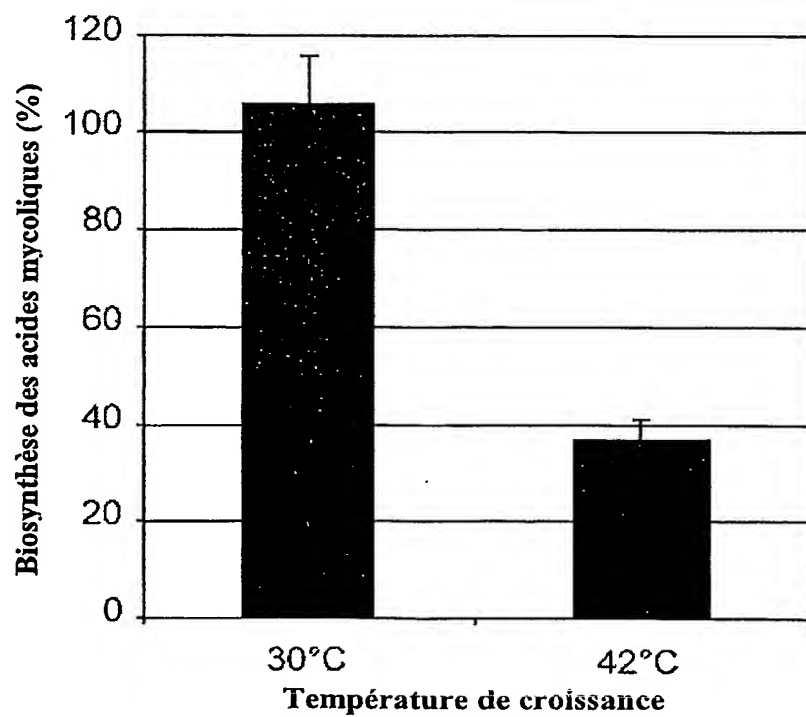


FIG. 4 (SUITE)

7/7

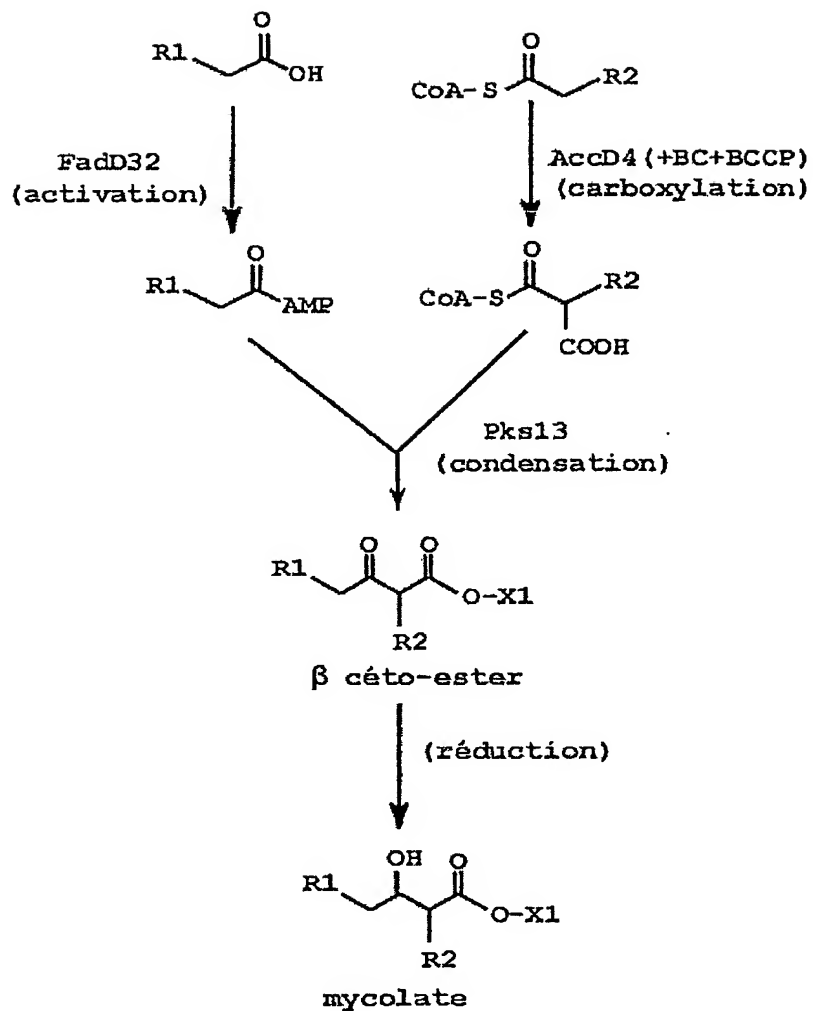


Fig. 5

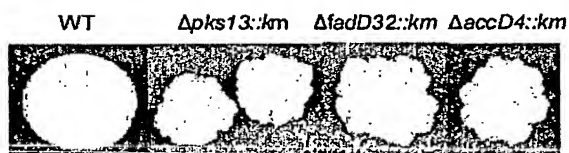


Fig. 6

## SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
 UNIVERSITE PARIS SUD XI  
 GUILHOT, Christophe  
 DAFPE, Mamadou  
 HOUSSIN, Christine  
 PORTEVIN, Damien  
 DE SOUSA, Célia

<120> UTILISATION DE LA PROTEINE PKS13 CODANT POUR LA CONDENSASE  
 DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES  
 COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES

<130> MJPVMAah644-112

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 <211> 1733  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1  
 Met Ala Asp Val Ala Glu Ser Gln Glu Asn Ala Pro Ala Glu Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Thr Val Pro Glu Met Arg Gln Trp Leu Arg Asn Trp Val Gly  
 20 25 30  
 Lys Ala Val Gly Lys Ala Pro Asp Ser Ile Asp Glu Ser Val Pro Met  
 35 40 45  
 Val Glu Leu Gly Leu Ser Ser Arg Asp Ala Val Ala Met Ala Ala Asp  
 50 55 60  
 Ile Glu Asp Leu Thr Gly Val Thr Leu Ser Val Ala Val Ala Phe Ala  
 65 70 75 80  
 His Pro Thr Ile Glu Ser Leu Ala Thr Arg Ile Ile Glu Gly Glu Pro  
 85 90 95  
 Glu Thr Asp Leu Ala Gly Asp Asp Ala Glu Asp Trp Ser Arg Thr Gly  
 100 105 110  
 Pro Ala Glu Arg Val Asp Ile Ala Ile Val Gly Leu Ser Thr Arg Phe  
 115 120 125  
 Pro Gly Glu Met Asn Thr Pro Glu Gln Thr Trp Gln Ala Leu Leu Glu  
 130 135 140  
 Gly Arg Asp Gly Ile Thr Asp Leu Pro Asp Gly Arg Trp Ser Glu Phe  
 145 150 155 160

Leu	Glu	Glu	Pro	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Gly	Ala	Arg	Thr	Arg	
				165					170					175		
Gly	Gly	Tyr	Leu	Lys	Asp	Ile	Lys	Gly	Phe	Asp	Ser	Glu	Phe	Phe	Ala	
			180					185					190			
Val	Ala	Lys	Thr	Glu	Ala	Asp	Asn	Ile	Asp	Pro	Gln	Gln	Arg	Met	Ala	
		195					200					205				
Leu	Glu	Leu	Thr	Trp	Glu	Ala	Leu	Glu	His	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Ser	
	210					215					220					
Ser	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Val	Gly	Val	Tyr	Ile	Gly	Ser	Ser	Thr	Asn	
225				230					235						240	
Asp	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Pro	Thr	Val	Ala	His	Pro	Tyr	
				245				250						255		
Ala	Ile	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Ile	Ala	Asn	Arg	Val	Ser	Tyr	
			260					265					270			
Phe	Tyr	Asp	Phe	His	Gly	Pro	Ser	Val	Thr	Ile	Asp	Thr	Ala	Cys	Ser	
		275					280					285				
Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Ile	His	Gln	Gly	Val	Gln	Ala	Leu	Arg	Asn	Gly	
	290					295					300					
Glu	Ala	Asp	Val	Val	Val	Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	
305					310					315					320	
Met	Val	Thr	Leu	Gly	Phe	Asp	Glu	Ile	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	
				325					330					335		
Gly	Arg	Ile	Lys	Ser	Phe	Ser	Ala	Asp	Ala	Asp	Gly	Tyr	Thr	Arg	Ser	
			340					345					350			
Glu	Gly	Gly	Gly	Met	Leu	Val	Leu	Lys	Arg	Val	Asp	Asp	Ala	Arg	Arg	
		355					360					365				
Asp	Gly	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Val	Ile	Ala	Gly	Ser	Ala	Val	Asn	His	
	370					375					380					
Asp	Gly	Arg	Ser	Asn	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Asn	Gln	Asp	Ala	Gln	Ala	
385					390					395					400	
Asp	Val	Leu	Arg	Arg	Ala	Tyr	Lys	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp	Pro	Arg	Thr	
				405					410					415		
Val	Asp	Tyr	Ile	Glu	Ala	His	Gly	Thr	Gly	Thr	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	
			420					425					430			
Ile	Glu	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala	
		435					440					445				
Asp	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Val	Lys	Thr	Asn	Val	Gly	His	Leu	
	450					455					460					

Glu 465	Ser	Ala	Ala	Gly 470	Ala	Ala	Ser	Met	Ala	Lys 475	Val	Val	Leu	Ala	Leu 480
Gln	His	Asp	Lys 485	Leu	Pro	Pro	Ser	Ile	Asn 490	Phe	Ala	Gly	Pro	Ser 495	Pro
Tyr	Ile	Asp	Phe 500	Asp	Ala	Met	Arg	Leu 505	Lys	Met	Ile	Thr	Thr 510	Pro	Thr
Asp	Trp	Pro 515	Arg	Tyr	Gly	Gly	Tyr 520	Ala	Leu	Ala	Gly	Val 525	Ser	Ser	Phe
Gly 530	Phe	Gly	Gly	Ala	Asn 535	Ala	His	Val	Val	Val	Arg 540	Glu	Val	Leu	Pro
Arg 545	Asp	Val	Val	Glu	Lys 550	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu 555	Pro	Glu	Pro	Lys	Ala 560
Ala	Ala	Glu	Pro	Ala 565	Glu	Ala	Pro	Thr	Leu 570	Ala	Gly	His	Ala	Leu 575	Arg
Phe	Asp	Glu	Phe 580	Gly	Asn	Ile	Ile	Thr 585	Asp	Ser	Ala	Val	Ala 590	Glu	Glu
Pro	Glu	Pro 595	Glu	Leu	Pro	Gly	Val 600	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu 605	Arg	Leu	Lys
Glu 610	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu 615	Ala	Ala	Gln	Glu	Val 620	Thr	Ala	Pro	Leu
Val 625	Pro	Leu	Ala	Val	Ser 630	Ala	Phe	Leu	Thr	Ser 635	Arg	Lys	Lys	Ala	Ala 640
Ala	Ala	Glu	Leu	Ala 645	Asp	Trp	Met	Gln	Ser 650	Pro	Glu	Gly	Gln	Ala 655	Ser
Ser	Leu	Glu	Ser 660	Ile	Gly	Arg	Ser	Leu 665	Ser	Arg	Arg	Asn	His 670	Gly	Arg
Ser	Arg	Ala 675	Val	Val	Leu	Ala	His 680	Asp	His	Asp	Glu	Ala 685	Ile	Lys	Gly
Leu 690	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Gly 695	Lys	Gln	Ala	Pro	Asn 700	Val	Phe	Ser	Val
Asp 705	Gly	Pro	Val	Thr	Thr 710	Gly	Pro	Val	Trp	Val 715	Leu	Ala	Gly	Phe	Gly 720
Ala	Gln	His	Arg	Lys 725	Met	Gly	Lys	Ser 730	Leu	Tyr	Leu	Arg	Asn	Glu 735	Val
Phe	Ala	Ala	Trp 740	Ile	Glu	Lys	Val	Asp 745	Ala	Leu	Val	Gln	Asp 750	Glu	Leu
Gly	Tyr	Ser 755	Val	Leu	Glu	Leu	Ile 760	Leu	Asp	Asp	Ala	Gln	Asp	Tyr	Gly 765

Ile	Glu	Thr	Thr	Gln	Val	Thr	Ile	Phe	Ala	Ile	Gln	Ile	Ala	Leu	Gly	770	775	780
Glu	Leu	Leu	Arg	His	His	Gly	Ala	Lys	Pro	Ala	Ala	Val	Ile	Gly	Gln	785	790	795
Ser	Leu	Gly	Glu	Ala	Ala	Ser	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	805	810	815
Arg	Asp	Ala	Thr	Arg	Ala	Ile	Cys	Ser	Arg	Ser	His	Leu	Met	Gly	Glu	820	825	830
Gly	Glu	Ala	Met	Leu	Phe	Gly	Glu	Tyr	Ile	Arg	Leu	Met	Ala	Leu	Val	835	840	845
Glu	Tyr	Ser	Ala	Asp	Glu	Ile	Arg	Glu	Val	Phe	Ser	Asp	Phe	Pro	Asp	850	855	860
Leu	Glu	Val	Cys	Val	Tyr	Ala	Ala	Pro	Thr	Gln	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	865	870	875
Pro	Pro	Glu	Gln	Val	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Arg	Ala	Glu	Ala	Glu	Gly	885	890	895
Lys	Phe	Ala	Arg	Lys	Phe	Ala	Thr	Lys	Gly	Ala	Ser	His	Thr	Ser	Gln	900	905	910
Met	Asp	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	Ile	Lys	915	920	925
Pro	Thr	Ser	Pro	Thr	Cys	Gly	Ile	Phe	Ser	Thr	Val	His	Glu	Gly	Arg	930	935	940
Tyr	Ile	Lys	Pro	Gly	Gly	Glu	Pro	Ile	His	Asp	Val	Glu	Tyr	Trp	Lys	945	950	955
Lys	Gly	Leu	Arg	His	Ser	Val	Tyr	Phe	Thr	His	Gly	Ile	Arg	Asn	Ala	965	970	975
Val	Asp	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Phe	Leu	Glu	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Val	980	985	990
Ala	Leu	Met	Gln	Val	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Asp	Ala	Gly	Leu	His	Asp	995	1000	1005
Ala	Gln	Leu	Ile	Pro	Thr	Leu	Ala	Arg	Lys	Gln	Asp	Glu	Val	Ser	Ser	1010	1015	1020
Met	Val	Ser	Thr	Met	Ala	Gln	Leu	Tyr	Val	Tyr	Gly	His	Asp	Leu	Asp	1025	1030	1035
Ile	Arg	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp	Tyr	Ala	Asn	1045	1050	1055
Ile	Pro	Pro	Thr	Arg	Phe	Lys	Arg	Lys	Glu	His	Trp	Leu	Pro	Ala	His	1060	1065	1070



Phe Ser Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Met Pro Gly Thr His Val Ala Leu  
 1075 1080 1085  
 Pro Asp Gly Arg His Val Trp Glu Tyr Ala Pro Arg Asp Gly Asn Val  
 1090 1095 1100  
 Asp Leu Ala Ala Leu Val Arg Ala Ala Ala Ala His Val Leu Pro Asp  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Gln Leu Thr Ala Ala Glu Gln Arg Ala Val Pro Gly Asp Gly Ala  
 1125 1130 1135  
 Arg Leu Val Thr Thr Met Thr Arg His Pro Gly Gly Ala Ser Val Gln  
 1140 1145 1150  
 Val His Ala Arg Ile Asp Glu Ser Phe Thr Leu Val Tyr Asp Ala Leu  
 1155 1160 1165  
 Val Ser Arg Ala Gly Ser Glu Ser Val Leu Pro Thr Ala Val Gly Ala  
 1170 1175 1180  
 Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Asp Gly Ala Pro Val Ala Pro Glu Thr  
 1185 1190 1195 1200  
 Pro Ala Glu Asp Ala Asp Ala Glu Thr Leu Ser Asp Ser Leu Thr Thr  
 1205 1210 1215  
 Arg Tyr Met Pro Ser Gly Met Thr Arg Trp Ser Pro Asp Ser Gly Glu  
 1220 1225 1230  
 Thr Ile Ala Glu Arg Leu Gly Leu Ile Val Gly Ser Ala Met Gly Tyr  
 1235 1240 1245  
 Glu Pro Glu Asp Leu Pro Trp Glu Val Pro Leu Ile Glu Leu Gly Leu  
 1250 1255 1260  
 Asp Ser Leu Met Ala Val Arg Ile Lys Asn Arg Val Glu Tyr Asp Phe  
 1265 1270 1275 1280  
 Asp Leu Pro Pro Ile Gln Leu Thr Ala Val Arg Asp Ala Asn Leu Tyr  
 1285 1290 1295  
 Asn Val Glu Lys Leu Ile Glu Tyr Ala Val Glu His Arg Asp Glu Val  
 1300 1305 1310  
 Gln Gln Leu His Glu His Gln Lys Thr Gln Thr Ala Glu Glu Ile Ala  
 1315 1320 1325  
 Arg Ala Gln Ala Glu Leu Leu His Gly Lys Val Gly Lys Thr Glu Pro  
 1330 1335 1340  
 Val Asp Ser Glu Ala Gly Val Ala Leu Pro Ser Pro Gln Asn Gly Glu  
 1345 1350 1355 1360  
 Gln Pro Asn Pro Thr Gly Pro Ala Leu Asn Val Asp Val Pro Pro Arg

1365								1370				1375					
Asp	Ala	Ala	Glu	Arg	Val	Thr	Phe	Ala	Thr	Trp	Ala	Ile	Val	Thr	Gly		
1380								1385				1390					
Lys	Ser	Pro	Gly	Gly	Ile	Phe	Asn	Glu	Leu	Pro	Arg	Leu	Asp	Asp	Glu		
1395								1400				1405					
Ala	Ala	Ala	Lys	Ile	Ala	Gln	Arg	Leu	Ser	Glu	Arg	Ala	Glu	Gly	Pro		
1410								1415				1420					
Ile	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	Ile	Glu	Ala	Leu	Ala		
1425								1430				1435				1440	
Asp	Lys	Val	Arg	Thr	Tyr	Leu	Glu	Ala	Gly	Gln	Ile	Asp	Gly	Phe	Val		
1445								1450				1455					
Arg	Thr	Leu	Arg	Ala	Arg	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Val	Phe		
1460								1465				1470					
Val	Phe	His	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Val	Val	Tyr	Glu	Pro	Leu	Leu		
1475								1480				1485					
Gly	Arg	Leu	Pro	Ala	Asp	Thr	Pro	Met	Tyr	Gly	Phe	Glu	Arg	Val	Glu		
1490								1495				1500					
Gly	Ser	Ile	Glu	Glu	Arg	Ala	Gln	Gln	Tyr	Val	Pro	Lys	Leu	Ile	Glu		
1505								1510				1515				1520	
Met	Gln	Gly	Asp	Gly	Pro	Tyr	Val	Leu	Val	Gly	Trp	Ser	Leu	Gly	Gly		
1525								1530				1535					
Val	Leu	Ala	Tyr	Ala	Cys	Ala	Ile	Gly	Leu	Arg	Arg	Leu	Gly	Lys	Asp		
1540								1545				1550					
Val	Arg	Phe	Val	Gly	Leu	Ile	Asp	Ala	Val	Arg	Ala	Gly	Glu	Glu	Ile		
1555								1560				1565					
Pro	Gln	Thr	Lys	Glu	Glu	Ile	Arg	Lys	Arg	Trp	Asp	Arg	Tyr	Ala	Ala		
1570								1575				1580					
Phe	Ala	Glu	Lys	Thr	Phe	Asn	Val	Thr	Ile	Pro	Ala	Ile	Pro	Tyr	Glu		
1585								1590				1595				1600	
Gln	Leu	Glu	Glu	Leu	Asp	Asp	Glu	Gly	Gln	Val	Arg	Phe	Val	Leu	Asp		
1605								1610				1615					
Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Gln	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Ile	Glu	His		
1620								1625				1630					
Gln	Arg	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp	Asn	Arg	Ala	Ile	Asp	Thr	Ala	Gln	Ile		
1635								1640				1645					
Gln	Pro	Tyr	Asp	Gly	His	Val	Thr	Leu	Tyr	Met	Ala	Asp	Arg	Tyr	His		
1650								1655				1660					

Asp Asp Ala Ile Met Phe Glu Pro Arg Tyr Ala Val Arg Gln Pro Asp  
 1665 1670 1675 1680

Gly Gly Trp Gly Glu Tyr Val Ser Asp Leu Glu Val Val Pro Ile Gly  
 1685 1690 1695

Gly Glu His Ile Gln Ala Ile Asp Glu Pro Ile Ile Ala Lys Val Gly  
 1700 1705 1710

Glu His Met Ser Arg Ala Leu Gly Gln Ile Glu Ala Asp Arg Thr Ser  
 1715 1720 1725

Glu Val Gly Lys Gln  
 1730

<210> 2

<211> 1610

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

Met Glu Gln Ser Gln Ser Ser Asp Gln Lys Met Thr Val Glu Gln Val  
 1 5 10 15

Arg Thr Trp Leu Arg Asp Trp Val Val Arg Thr Thr Gly Ile Pro Val  
 20 25 30

Glu Glu Val Thr Asp Asp Lys Ala Met Glu Thr Phe Gly Leu Ser Ser  
 35 40 45

Arg Asp Val Val Val Leu Ser Gly Glu Leu Glu Asn Leu Leu Asp Thr  
 50 55 60

Ser Leu Asp Ala Thr Ile Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Ile Arg Ser Leu  
 65 70 75 80

Ala Gln Arg Leu Val Glu Gly Glu Pro Arg Arg Ala His Thr Gln Arg  
 85 90 95

Glu Leu Asn Phe Ser Ala Val Ser Asp Ser Pro Gly Ser His Asp Ile  
 100 105 110

Ala Val Val Gly Met Ala Ala Arg Tyr Pro Gly Ala Glu Ser Leu Glu  
 115 120 125

Asp Met Trp Lys Leu Leu Val Glu Gly Arg Asp Gly Ile Ser Asp Leu  
 130 135 140

Pro Ile Gly Arg Trp Ser Glu Tyr Ala Gly Asp Glu Val Met Ser Arg  
 145 150 155 160

Lys Met Glu Glu Phe Ser Thr Ile Gly Gly Tyr Leu Ser Asp Ile Ser  
 165 170 175

Ser	Phe	Asp	Ala	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Leu	Glu	Ala	Ala	Asn	180	185	190
Met	Asp	Pro	Gln	Gln	Arg	Ile	Leu	Leu	Glu	Leu	Thr	Trp	Glu	Ala	Leu	195	200	205
Glu	Tyr	Ala	Arg	Ile	Ala	Pro	Asn	Thr	Leu	Arg	Gly	Glu	Ala	Val	Gly	210	215	220
Val	Phe	Ile	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asp	Tyr	Gly	Met	Met	Ile	Ala	Ala	225	230	235
Asp	Pro	Ala	Glu	Ala	His	Pro	Tyr	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	245	250	255
Ile	Val	Ala	Asn	Arg	Ile	Asn	Tyr	Ala	Phe	Asp	Phe	Arg	Gly	Pro	Ser	260	265	270
Val	Asn	Val	Asp	Thr	Ala	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Val	His	Gln	275	280	285
Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Arg	Asn	Gly	Glu	Ala	Asp	His	Ala	Ile	Ala	Gly	290	295	300
Gly	Val	Asn	Ile	Leu	Ala	Ser	Pro	Phe	Val	Thr	Thr	Ala	Phe	Ala	Glu	305	310	315
Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	His	Ala	Phe	Ser	Asp	Asp	325	330	335
Ala	Asp	Gly	Phe	Val	Arg	Ser	Asp	Gly	Ala	Gly	Val	Val	Val	Leu	Lys	340	345	350
Arg	Val	Asp	Asp	Ala	Ile	Arg	Asp	Gly	Asp	Lys	Ile	Ile	Gly	Val	Ile	355	360	365
Lys	Gly	Ser	Ala	Val	Asn	Ser	Asp	Gly	His	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Ala	370	375	380
Pro	Asn	Pro	Asp	Ala	Gln	Val	Asp	Val	Leu	Gln	Arg	Ala	Tyr	Val	Asp	385	390	395
Ala	Gln	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	Val	Asp	Tyr	Val	Glu	Ala	His	Gly	Thr	405	410	415
Gly	Thr	Ile	Leu	Gly	Asp	Pro	Ile	Glu	Ala	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Val	420	425	430
Leu	Gly	Tyr	Gly	Arg	Asp	Ala	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	Ala	435	440	445
Lys	Ser	Asn	Phe	Gly	His	Thr	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Val	450	455	460
Ile	Lys	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Gln	Asn	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	465	470	475

Asn	Phe	Ala	Gly	Pro	Asn	Arg	Tyr	Ile	Asp	Phe	Asp	Ala	Glu	Arg	Leu	485	490	495
Glu	Val	Val	Glu	Asp	Pro	Arg	Glu	Trp	Pro	Glu	Tyr	Asn	Gly	His	Ala	500	505	510
Val	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Phe	Gly	Phe	Gly	Gly	Thr	Asn	Ala	His	Val	515	520	525
Val	Ile	Ser	Glu	Tyr	Asn	Ala	Glu	Asp	Tyr	Glu	Thr	Arg	Ala	Pro	Lys	530	535	540
Glu	Ala	Leu	Leu	Pro	Asp	Gln	Gln	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Ser	Gly	His	545	550	555
Leu	Pro	Ser	Arg	Arg	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Ala	Asp	Phe	Leu	565	570	575
Glu	Gly	Arg	Lys	Asp	Cys	Asp	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	580	585	590
Gly	Arg	Asn	His	Gly	Arg	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Thr	Ile	595	600	605
Glu	Glu	Ala	Val	Lys	Arg	Leu	Arg	Gln	Val	Ala	Glu	Gly	Lys	Val	Ser	610	615	620
Val	Gly	Ile	Ser	Ala	Ala	Asp	Ser	Pro	Ala	Ala	Asn	Gly	Pro	Val	Phe	625	630	635
Val	Tyr	Ser	Gly	Phe	Gly	Ser	Gln	His	Arg	Leu	Met	Ile	Lys	Glu	Leu	645	650	655
Cys	Ser	Ile	Ser	Pro	Gln	Phe	Arg	Glu	Arg	Ile	Glu	Glu	Leu	Asp	Glu	660	665	670
Met	Val	Lys	Phe	Glu	Ser	Gly	Trp	Ser	Ile	Met	Lys	Leu	Val	Leu	Asp	675	680	685
Asp	Glu	Gln	Thr	Tyr	Asp	Thr	Glu	Thr	Ala	Gln	Val	Val	Ile	Thr	Ala	690	695	700
Ile	Gln	Ile	Ala	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Phe	Gly	Val	Lys	Pro	705	710	715
Ala	Ala	Val	Met	Gly	Met	Ser	Met	Gly	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ala	725	730	735
Ala	Gly	Gly	Leu	Ser	Asp	Arg	Asp	Thr	Met	Leu	Ile	Ala	Ser	His	Arg	740	745	750
Ser	Arg	Leu	Met	Gly	Glu	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Ala	Glu	Asp	Gln	Leu	755	760	765
Gly	Ala	Met	Ala	Val	Val	Glu	Phe	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Asp	Lys	Phe	770	775	780

Ile	Glu	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Lys	Gly	Ile	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Ala	
785					790					795					800	
Gly	Pro	Gly	Met	Thr	Thr	Val	Gly	Gly	Pro	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Gln	
			805						810					815		
Phe	Val	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Lys	Phe	Ala	Arg	Leu	Leu	Asn	
			820					825					830			
Val	Lys	Gly	Ala	Gly	His	Thr	Ser	Ala	Val	Glu	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	
		835					840					845				
Leu	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	Gly	Ile	Glu	Pro	Leu	Pro	Leu	Gln	Ile	Pro	
	850					855					860					
Leu	Phe	Ser	Ser	Val	Asp	Gln	Gly	Val	Thr	Tyr	Pro	Val	Gly	Ala	Val	
865					870					875					880	
Val	His	Asp	Ala	Asp	Tyr	Met	Leu	Arg	Cys	Thr	Arg	Gln	Ser	Val	Tyr	
				885					890					895		
Phe	Gln	Asp	Ser	Thr	Glu	Ala	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	His	Asn	Thr	Leu	
			900					905					910			
Val	Glu	Ile	Ser	Pro	Asn	Pro	Val	Ala	Leu	Met	Gly	Met	Met	Asn	Thr	
		915					920					925				
Ala	Phe	Thr	Val	Gly	Lys	Pro	Asp	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Lys	
	930					935					940					
Arg	Lys	Val	Pro	Glu	Ala	Glu	Ser	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Leu	
945					950					955					960	
Tyr	Val	Asn	Gly	Ala	Asn	Val	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	Tyr	Gly	Glu	Gly	
			965					970						975		
Glu	Thr	Ile	Asp	Pro	Pro	His	Ile	Thr	Trp	Lys	His	Gln	Arg	Phe	Trp	
			980					985					990			
Thr	Ser	Ala	Arg	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	Pro	Gly	Phe	
		995					1000					1005				
Arg	Val	Asn	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	Val	Ala	Phe	Ser	Thr	Ala	Ala	Glu	
	1010					1015					1020					
Leu	Ala	Pro	Ser	Ala	Val	Ala	Ile	Met	Glu	Ala	Ala	Ala	Met	Ala	Val	
1025					1030					1035					1040	
Thr	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Asp	Glu	Arg	Asp	Met	Leu	Pro	
			1045						1050					1055		
Pro	Ser	Gly	Glu	Ile	Thr	Thr	Ile	Val	Thr	Arg	Ser	Leu	Gly	Gly	Leu	
		1060					1065						1070			
Ser	Leu	Ser	Val	Tyr	Lys	Ile	Glu	Gly	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Val	Ala	
	1075						1080					1085				

Glu	Gly	Phe	Ala	Ala	Asn	Pro	Gly	Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Phe	Asp	1090	1095	1100
Gly	Pro	Gly	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ser	Asp	Gln	Pro	Asp	1105	1110	1115
Pro	Arg	Ser	Asp	Leu	Pro	Leu	Asp	Ile	Glu	Ala	Val	Arg	Trp	Asp	Pro	1125	1130	1135
Ala	Thr	Glu	Thr	Val	Glu	Glu	Arg	Met	Arg	Ala	Ile	Val	Ser	Glu	Ala	1140	1145	1150
Met	Gly	Tyr	Asp	Val	Asp	Asp	Leu	Pro	Arg	Glu	Leu	Pro	Leu	Ile	Asp	1155	1160	1165
Leu	Gly	Leu	Asp	Ser	Leu	Met	Gly	Met	Arg	Ile	Lys	Asn	Arg	Ile	Glu	1170	1175	1180
Asn	Asp	Phe	Gln	Ile	Pro	Pro	Leu	Gln	Val	Gln	Ala	Leu	Arg	Asp	Ala	1185	1190	1195
Ser	Val	Ala	Asp	Val	Val	Ile	Met	Val	Glu	Asn	Met	Val	Ala	Gly	Arg	1205	1210	1215
Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ala	Thr	Pro	Gln	Val	Pro	Ala	Glu	Ala	1220	1225	1230
Ala	Gly	Glu	Ala	Gln	Ala	Ala	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Glu	Asp	Val	1235	1240	1245
Gln	Gly	Val	Gly	Val	Ala	Pro	Arg	Asp	Ala	Ser	Glu	Arg	Met	Val	Phe	1250	1255	1260
Gly	Thr	Trp	Ala	Gly	Leu	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Thr	Ser	1265	1270	1275
Lys	Leu	Pro	Gln	Ile	Asp	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	1285	1290	1295
Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Gly	Ile	Glu	Ile	Ser	Thr	Glu	Gln	Val	Leu	Ala	1300	1305	1310
Ala	Glu	Thr	Leu	Glu	Pro	Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Arg	Glu	Gly	Leu	Glu	1315	1320	1325
Thr	Glu	Val	Gln	Gly	Asn	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Arg	Ala	Glu	Gly	1330	1335	1340
Ser	Thr	Lys	Pro	Ala	Val	Phe	Met	Phe	His	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	1345	1350	1355
Val	Val	Tyr	Gln	Pro	Leu	Met	Arg	Arg	Leu	Pro	Glu	Asp	Val	Pro	Val	1365	1370	1375
Tyr	Gly	Val	Glu	Arg	Leu	Glu	Gly	Asp	Leu	Ala	Asp	Arg	Ala	Ala	Ala	1380	1385	1390

12/18

Tyr Val Asp Asp Ile Lys Lys Tyr Ser Asp Gly Phe Pro Val Val Leu  
 1395 1400 1405  
 Gly Gly Trp Ser Phe Gly Gly Ala Val Ala Phe Glu Val Ala His Gln  
 1410 1415 1420  
 Leu Val Gly Ser Asp Val Glu Val Ala Thr Val Ala Leu Leu Asp Thr  
 1425 1430 1435 1440  
 Val Gln Pro Ser Asn Pro Ala Pro Asp Thr Ala Glu Glu Thr Arg Ala  
 1445 1450 1455  
 Arg Trp Thr Arg Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Lys Thr Tyr Gly Leu Asp  
 1460 1465 1470  
 Phe Glu Val Pro Phe Glu Ile Leu Asp Thr Ile Gly Glu Asp Gly Met  
 1475 1480 1485  
 Leu Ser Met Met Thr Asp Phe Leu Ala Asn Thr Asp Ala Ser Glu His  
 1490 1495 1500  
 Gly Leu Ser Ala Gly Val Leu Glu His Gln Arg Ala Ser Phe Val Asp  
 1505 1510 1515 1520  
 Asn Arg Ile Leu Ala Lys Leu Asn Phe Ala Asp Trp Ala Asn Val Glu  
 1525 1530 1535  
 Ala Pro Val Ile Leu Phe Arg Ala Glu Arg Met His Asp Gly Ala Ile  
 1540 1545 1550  
 Glu Leu Glu Pro Asn Tyr Ala Lys Ile Asp Gln Asp Gly Gly Trp Ser  
 1555 1560 1565  
 Gly Ile Val Asn Asp Leu Glu Ile Val Gln Leu Asn Gly Asp His Leu  
 1570 1575 1580  
 Ala Val Val Asp Glu Pro Glu Ile Gly Thr Val Gly Ala His Leu Ser  
 1585 1590 1595 1600  
 Arg Arg Ile Asp Glu Ile Ser Arg Lys Asn  
 1605 1610

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR pks13a

<400> 3  
 gctggarctv acvtgggarg c



<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pks13b

<400> 4  
gtgsgcgttg gydccraavc cgaa

24

<210> 5  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Rtb

<400> 5  
gaggacatat ggctgacgta gcggaatc

28

<210> 6  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Stb

<400> 6  
cggtgaaagc ttctgcttgc ctacctcact tg

32

<210> 7  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Ttb

<400> 7  
gctcggggat cctcactgct tgcctacctc ac

32

<210> 8  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Ccg

<400> 8  
aatatgacta gtagccaatc gtcggatcag aag 33

<210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Dcg

<400> 9  
agctctagat ctctaattct tccgagaaat ctcac 35

<210> 10  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pkde15

<400> 10  
gaaatctcga gccacggcga aa 22

<210> 11  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pkde12

<400> 11  
acgattgccg cggttccata ttg 23

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pkde13

<400> 12  
catcctgttc cgcggaacgc atgc 24

<210> 13  
<211> 23  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR pkde14

<400> 13

cagcatgatg gagatctgag ggc

23

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR fa2

<400> 14

tctgaccacc ttccgtgaag c

21

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR ac2

<400> 15

gaacgagttc agagcttc

18

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR K10

<400> 16

tatttcgaat ggttcgctgg gtttatc

27

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR K7

<400> 17

taaaaagctt atcgataccg

20

<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk1

<400> 18  
gccgtgacgg tatctcgg 18

<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk2

<400> 19  
ccagggcagt tgcttcaatg 20

<210> 20  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk3

<400> 20  
tccggaaaga tctcacgccg cg 22

<210> 21  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk4

<400> 21  
gcgtgcgcgc agatctgcta gc 22

<210> 22  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13F

<400> 22  
gctctagagt tttaaacgctg gacctgtcca acgtcaagg 39

<210> 23  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13G

<400> 23  
ggactagtcg tcgaaaccga ccgtcaccag 30

<210> 24  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13H

<400> 24  
ggactagtcg gcattcttcaa cgagttgc 28

<210> 25  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13I

<400> 25  
cccaagcttg tttaaacttg tcgaagtggg tcgacgg 37

<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13J

<400> 26  
cttccacgac atggtctgat 20

<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13K

<400> 27

cacgatcgag tcgagctcga

20

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR H1

<400> 28

agcaccagcg gttcgccgt

19

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR H2

<400> 29

tgcacgactt cgagggtgttc g

21

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13R

<400> 30

atgagatctg atgaaaacca cagcgat

27

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13P

<400> 31

ggactagtct tggcgacggc cttctcac

28

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002257

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N9/10 C12N15/54 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, PAJ, WPI Data, FSTA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE PIR 'Online! 17 November 2000 (2000-11-17), "Probable polyketide synthase pks13" XP002314378 retrieved from NCBI Database accession no. D70887 the whole document	1-3,5-8
X	DATABASE PIR 'Online! 15 June 2001 (2001-06-15), "Polyketide synthase" XP002314379 retrieved from NCBI Database accession no. E86921 Equivalent de TrEMBL:Q9CDB1 the whole document	1-3,5-8
----- -/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2005

Date of mailing of the international search report

02/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Piret, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/002257

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE GENBANK            9 December 2002 (2002-12-09), "Polyketide synthase"            XP002314380            retrieved from NCBI            Database accession no. NP_338459            cited in the application            Equivalent de TrEMBL:053579            the whole document</p>	1-3,5-8
X	<p>DATABASE GENBANK 'Online!            24 July 2003 (2003-07-24), "Putative polyketide synthase"            XP002314381            retrieved from NCBI            Database accession no. BAC19515            Equivalent de TrEMBL:Q8FM04            the whole document</p>	1,2,4-8
X	<p>DATABASE GENBANK 'Online!            8 August 2002 (2002-08-08), "Polyketide synthase modules and related proteins"            XP002314403            retrieved from NCBI            Database accession no. BAC00265            Equivalent de TrEMBL:Q8NLR7            the whole document</p>	1,2,4-8
P,X	<p>PORTEVIN DAMIEN ET AL: "A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms."            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES,            vol. 101, no. 1,            6 January 2004 (2004-01-06), pages 314-319, XP002277487            January 6, 2004            ISSN: 0027-8424 (ISSN print)            cited in the application            the whole document</p>	1-11
A	<p>ASSELINEAU CECILE ET AL: "The biosynthesis of mycolic acids by Mycobacteria: Current and alternative hypotheses"            PROGRESS IN LIPID RESEARCH,            vol. 41, no. 6, November 2002 (2002-11), pages 501-523, XP002277485            ISSN: 0163-7827            page 517, paragraph 6.9 - page 521</p>	

-/--



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002257

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MINNIKIN DAVID E ET AL: "The methyl-branched fortifications of Mycobacterium tuberculosis" CHEMISTRY AND BIOLOGY (LONDON), vol. 9, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 545-553, XP002277486 ISSN: 1074-5521	
A	LEE RICHARD E ET AL: "Mycolic acid biosynthesis: Definition and targeting of the Claisen condensation step" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1346, no. 3, 1997, pages 275-284, XP001187598 ISSN: 0006-3002	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCI/FR2004/002257

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N9/10 C12N15/54 G01N33/50

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, PAJ, WPI Data, FSTA

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE PIR 'Online! 17 novembre 2000 (2000-11-17), "Probable polyketide synthase pks13" XP002314378 extrait de NCBI Database accession no. D70887 le document en entier	1-3,5-8
X	DATABASE PIR 'Online! 15 juin 2001 (2001-06-15), "Polyketide synthase" XP002314379 extrait de NCBI Database accession no. E86921 Equivalent de TrEMBL:Q9CDB1 le document en entier	1-3,5-8

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 janvier 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/02/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Piret, B

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. de Internationale No

PCT/FR2004/002257

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE GENBANK            9 décembre 2002 (2002-12-09), "Polyketide synthase"            XP002314380            extrait de NCBI            Database accession no. NP_338459            cité dans la demande            Equivalent de TrEMBL:053579            le document en entier</p> <p>-----</p>	1-3,5-8
X	<p>DATABASE GENBANK 'Online!            24 juillet 2003 (2003-07-24), "Putative polyketide synthase"            XP002314381            extrait de NCBI            Database accession no. BAC19515            Equivalent de TrEMBL:Q8FM04            le document en entier</p> <p>-----</p>	1,2,4-8
X	<p>DATABASE GENBANK 'Online!            8 août 2002 (2002-08-08), "Polyketide synthase modules and related proteins"            XP002314403            extrait de NCBI            Database accession no. BAC00265            Equivalent de TrEMBL:Q8NLR7            le document en entier</p> <p>-----</p>	1,2,4-8
P,X	<p>PORTEVIN DAMIEN ET AL: "A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms."            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES,            vol. 101, no. 1,            6 janvier 2004 (2004-01-06), pages 314-319, XP002277487            January 6, 2004            ISSN: 0027-8424 (ISSN print)            cité dans la demande            le document en entier</p> <p>-----</p>	1-11
A	<p>ASSELINEAU CECILE ET AL: "The biosynthesis of mycolic acids by Mycobacteria: Current and alternative hypotheses"            PROGRESS IN LIPID RESEARCH,            vol. 41, no. 6, novembre 2002 (2002-11),            pages 501-523, XP002277485            ISSN: 0163-7827            page 517, alinéa 6.9 - page 521</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/002257

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MINNIKIN DAVID E ET AL: "The methyl-branched fortifications of Mycobacterium tuberculosis" CHEMISTRY AND BIOLOGY (LONDON), vol. 9, no. 5, mai 2002 (2002-05), pages 545-553, XP002277486 ISSN: 1074-5521	
A	LEE RICHARD E ET AL: "Mycolic acid biosynthesis: Definition and targeting of the Claisen condensation step" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1346, no. 3, 1997, pages 275-284, XP001187598 ISSN: 0006-3002	